ANNALES

DE

L'INSTITUT NATIONAL

DE LA

RECHERCHE AGRONOMIQUE

RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
MINISTÈRE DE L'AGRICULTURE

ANNALES DE L'INSTITUT NATIONAL
DE LA
RECHERCHE AGRONOMIQUE

SÉRIE E

ANNALES
DE TECHNOLOGIE AGRICOLE

CONSERVATION ET TRANSFORMATION DES PRODUITS AGRICOLES

INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE
7, rue Keppler – Paris

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE DES ACTIVEURS ET DES INHIBITEURS DE LA FERMENTATION ALCOOLIQUE DES MOUTS DE RAISIN

PAR

Mlle S. LAFOURCADE

Ingénieur Docteur

Deuxième partie

INHIBITEURS DE LA CROISSANCE DES LEVURES ET DE LA FERMENTATION ALCOOLIQUE

Dans une étude d'ensemble sur les substances capables d'arrêter la fermentation alcoolique, L. Genevois, en 1936 (67), considérait trois catégories de produits agissant sur les levures :

1° Les narcotiques, substances généralement liposolubles, qui s'attaquent à toutes les fonctions de la cellule, mais dont l'action est strictement réversible. Après élimination de ces substances, les cellules reprennent la totalité de leur activité. Ce sont des carbures, des alcools supérieurs, simples ou halogénés.

2° Les antiseptiques, capables de tuer la cellule. Dans ce groupe, particulièrement étendu et varié, nous rencontrons les acides benzoïque et salicylique et leurs dérivés, les fluorures, l'acide sulfureux à forte dose et à pH bas, l'isosulfocyanate d'allyle, etc. A faible dose les fluorures rentrent dans le troisième groupe.

3° Les inhibiteurs spécifiques de la fermentation, capables de bloquer les fermentations alcoolique et lactique de la cellule, sans par ailleurs arrêter sa respiration et sa croissance, du moins dans une zone étroite de concentrations. Ce sont les acides α-halogénés, tels l'acide monobromacétique. A plus fortes doses, ces corps entrent simplement dans la catégorie des antiseptiques banaux.

Depuis cette date, on connaît d'autres catégories de produits actifs sur les microorganismes et on peut ajouter à la liste précédente :

4° Certains corps tensioactifs ionisables, à fort pouvoir mouillant et moussant, enrobant les cellules par action de surface, comme les sels

d'ammonium quaternaire. Ils sont bactériostatiques et bactéricides, ou fongistatiques et fongicides.

5° Les antivitamines, substances se rapprochant par leur constitution chimique de certaines vitamines ou facteurs de croissance, dont elles sont une réplique que la cellule utilise par ce qu'on pourrait appeler une erreur fatale, car elles bloquent tout métabolisme et entraînent la mort de la cellule. Ce sont des substances comme les sulfamides, antivitamines de l'acide *p*-aminobenzoïque.

6° Enfin les antibiotiques, substances produites par des moisissures, des actinomyces ou des bactéries, qui se montrent capables d'inhiber la croissance d'autres microorganismes ou de les détruire. Alors que les produits précédemment énumérés agissent en général plus ou moins sur toutes les cellules, les antibiotiques présentent une très grande spécificité dans leur inhibition. Par exemple certains sont actifs contre quelques catégories de bactéries et d'autres agissent seulement sur certaines espèces de levures.

L'étude de l'action sur les levures de vin de ces substances nouvelles s'imposait et la deuxième partie de notre travail lui est consacrée. De plus, nous avons découvert, en collaboration avec E. PEYNAUD, parmi de nouveaux produits fongicides de synthèse, des substances fortement antiseptiques vis-à-vis des levures, dont il sera également fait état.

Nous étudierons successivement dans le chapitre VI, sous le titre général « Action des antiseptiques sur les levures », l'effet de l'anhydride sulfureux et les modalités de son emploi, les limites d'efficacité dans le moût et dans le vin de certains antiseptiques, l'action des sulfamides et des sels d'ammonium quaternaire.

CHAPITRE VI

ACTION DES ANTISEPTIQUES SUR LES LEVURES

I. — L'anhydride sulfureux

Le gaz sulfureux est employé depuis des siècles dans la pratique des chais pour la conservation des vins. On connaît ses avantages pour interdire les altérations microbiennes des vins rouges et les refermentations des vins doux. On connaît aussi les inconvénients d'ordres gustatif et hygiénique de son emploi à doses exagérées et on comprend qu'on ait souvent cherché à lui substituer d'autres produits. Cependant on n'a peut-être pas encore suffisamment essayé de préciser les conditions de son application dans les vins doux permettant d'en limiter les doses.

On détermine couramment dans les vins blancs sulfités l'acide sulfureux « libre » et l'acide sulfureux « combiné ». L'acide sulfureux « libre » est l'acide titrable directement par l'iode en milieu acide ; c'est cette teneur qui a une importance pratique, car l'acide sulfureux « libre » est en équilibre avec la concentration en anhydride sulfureux (SO_2) réellement active au point de vue antiseptique qui, suivant l'acidité réelle du vin, est de l'ordre de 1 à 10 p. 100 de l'acide sulfureux « libre ». L'acide sulfureux « combiné » est l'acide sulfureux à l'état de combinaison hydrolysable à froid en milieu alcalin : il n'a par lui-même aucune propriété antiseptique. C'est précisément le grand défaut de l'acide sulfureux de nécessiter, pour maintenir quelques milligrammes par litre de produit actif, la présence de quelques dizaines de milligrammes sous la forme libre et souvent de quelques centaines de milligrammes sous la forme combinée.

L'acide sulfureux combiné est constitué par des combinaisons d'addition à des corps possédant des fonctions aldéhydiques ou cétoniques ; ces corps sont en particulier l'éthanal et les différents sucres. Ces combinaisons se distinguent par leurs stabilités différentes.

La combinaison sulfitique de l'éthanal est assez stable et sa dissociation chimique est pratiquement négligeable. Par contre, l'acide glucose-sulfureux est peu stable et se trouve en équilibre dépendant des conditions de température (68) ; il en est de même de l'acide lévulose-sulfureux. En somme l'acide sulfureux combiné des vins liquoreux comprend deux catégories de combinaisons : l'une stable, définitive, qu'il est, une fois formée, impossible de réduire ; l'autre dissociable, qui suit la valeur de l'acide sulfureux libre du vin, augmente à chaque sulfitage et baisse de manière continue au cours de la conservation, entre deux additions d'anhydride sulfureux.

Pour éviter d'obtenir des teneurs élevées en acide sulfureux combiné dans un vin, il n'y a donc qu'un seul moyen possible : éviter les teneurs élevées du vin en éthanal qui fixe l'acide sulfureux de manière définitive. L'équilibre sucre-acide sulfureux est imposé par les concentrations respectives en présence sur lesquelles on ne peut agir que de façon limitée ; on ne peut descendre, en effet, au-dessous d'une certaine teneur en acide sulfureux libre sans risque de refermentation.

Dans la pratique, il convient donc de rechercher les conditions de vinification et de conservation des vins liquoreux dans lesquelles la formation d'éthanal est minimum.

a) **Influence du sulfitage du moût sur la formation d'éthanal.** — Aux doses légalement admises dans les vins, l'acide sulfureux se conduit comme un antiseptique faible, ou plus exactement comme un narcotique. En effet, en présence des doses habituellement utilisées, si la plus grande

partie des levures est tuée, nous verrons qu'il reste toujours suffisamment de cellules vivantes pour déclancher la fermentation lorsque la protection de l'acide sulfureux cesse. La levure réagit contre l'antiseptique. Le mécanisme d'auto-défense mis en jeu par les levures pour neutraliser l'inhibiteur est facile à montrer par les deux expériences suivantes.

On répartit un même moût stérile dans une série de flacons. Chacun d'eux reçoit des doses croissantes d'acide sulfureux allant de 50 à 250 mg par litre. On ensemence ensuite avec un levain d'une culture pure de levures et on laisse incuber à 25°C à l'abri de l'air. Les fermentations se déclarent avec plus ou moins de retard, mais après un temps variant avec l'importance de l'addition d'acide sulfureux, tout le sucre est finalement transformé dans chacun des flacons. On procède alors au dosage de l'éthanal et le tableau X reproduit les résultats de ces analyses.

TABLEAU X

Formation d'éthanal dans des moûts diversement sulfités avant fermentation

Les teneurs sont des mg par litre.

SO_2 ajouté au moût	SO_2 total du vin	SO_2 disparu	Ethanal du vin	Ethanal fixé par SO_2	SO_2 fixé par l'éthanal
0	—	—	24		—
56	32	24	48	24	35
112	79	33	76	52	75
168	118	50	101	77	112
224	150	74	131	107	156

On constate que les quantités d'éthanal produites et les quantités d'acide sulfureux qu'elles fixent augmentent régulièrement et presque proportionnellement aux doses d'acide sulfureux introduites initialement.

Dans une autre expérience, on mute un jus de raisin de 13° Baumé avec 250 mg de SO_2 par litre au moment où, en pleine fermentation, il titre encore 75 g de sucre et présente 20 mg par litre d'éthanal. On opère cette addition d'une part en présence de toutes les levures, au nombre de 99 000 par mm^3, et d'autre part après les avoir éliminées par centrifugation et filtration. On bouche d'un tampon d'ouate les deux flacons qu'on conserve à la température de 20°C.

Dès l'introduction de l'acide sulfureux, la fermentation est arrêtée dans les deux flacons. Les levures se déposent progressivement au fond du premier. On note leur comportement au cours des 24 heures qui suivent le sulfitage, par numération des cellules vivantes. Une heure après le traitement, ce nombre reste inchangé : les levures ne sont pas

affectées par l'acide sulfureux durant la première heure. 5 heures après cependant, la population active se trouve diminuée de 90 p. 100. 24 heures après, pratiquement toutes les cellules ont perdu la faculté de se reproduire, il ne reste que quelques cellules pour mille donnant des colonies. Au contraire, l'hématimètre accuse toujours la même concentration cellulaire totale. Lorsqu'on suit ultérieurement la concentration en éthanal du vin, on constate qu'elle a sensiblement triplé 4 jours après le mutage. Après 11 jours, elle est cinq fois plus forte. Dans le flacon muté en l'absence des levures, la teneur en éthanal est restée inchangée. Les levures continuent donc à réagir contre l'acide sulfureux. Le tableau XI exprime cette évolution, ainsi que l'équilibre SO_2 libre-SO_2 combiné qui en résulte.

TABLEAU XI

Formation d'éthanal dans diverses conditions de mutage

Le mutage a été effectué avec 250 mg de SO_2 par litre.
Teneurs en mg par litre.

	Délai après mutage en jours	SO_2 libre	SO_2 total	SO_2 combiné	Ethanal	SO_2 combiné à l'éthanal
Muté avec toutes les levures (99 000)	4	53	260	207	60	87
	11	33	258	225	103	150
Muté après élimination des levures	4	71	260	189	20	29
	11	67	252	185	20	29

b) **Conditions du mutage.** — En résumé, l'action de l'acide sulfureux sur les levures n'est pas instantanée, comme on aurait pu le supposer. C'est peu à peu qu'il atteint toutes les cellules à la manière d'un narcotique. Tandis que la transformation du sucre est immédiatement stoppée, vraisemblablement par blocage des enzymes, le taux d'éthanal continue à croître comme si les levures tentaient de bloquer une certaine proportion d'acide sulfureux, pour diminuer les quantités d'antiseptique actif. Les levures sont à l'état de vie ralentie, mais elles ne sont pas mortes. Si le sulfitage n'a pas été suffisant, elles parviennent à déplacer l'équilibre SO_2 libre-SO_2 combiné et il leur faut peu de temps alors pour achever la fermentation interrompue. Pour s'en convaincre, il suffit d'ensemencer un moût stérile avec deux gouttes d'un milieu ainsi muté et qui semble privé de vie : deux jours après, il est le siège d'une active fermentation.

De cet ensemble de faits, nous avons tiré les conclusions suivantes, qui ont été développées ailleurs (69) : Afin de limiter au maximum les teneurs en acide sulfureux total des vins, il convient : 1° de ne pas intro-

duire d'acide sulfureux dans le moût avant la fermentation, ou de limiter le plus possible cette introduction, compte tenu des nécessités d'une vinification saine ; 2° de procéder à l'élimination des levures aussi rapidement et aussi complètement que possible, soit avant mutage, soit peu de temps après l'introduction de l'acide sulfureux ; 3° d'éviter les refermentations, ce qui sera d'autant plus facile à obtenir que les conditions de 1° et 2° auront été mieux réalisées.

II. — Limites d'efficacité de certaines substances antiseptiques

Nous avons étudié dans leur action sur les levures, un grand nombre de substances dont le pouvoir antiseptique était connu. Nous avons chiffré le seuil de leur activité dans le moût de raisin et le vin. A cet effet,

TABLEAU XII

Liste des antiseptiques essayés et limites d'activités

Noms des produits	Propriétés	Action sur la fermentation
Acide caféique		50 mg par l retardent de quelques heures la fermentation du moût de raisin.
Acide déhydroacétique (70)	Antifongique.	50 mg par l retardent de 48 h le départ de la fermentation, mais elle se termine normalement.
Acide férulique		Aucune action sur les levures.
Acide monobromacétique (71)	Antiseptique.	La fermentation du moût est inhibée par 20 mg par l, celle du vin par 10 mg.
Azothydrate de sodium (72)	Antiseptique.	La fermentation du moût est inhibée par 5 mg par l.
Bromacétate d'éthylglycol (71)	Antiseptique.	La fermentation du moût est inhibée par 50 mg par l, celle du vin par 20 mg.
Chloramine T	Oxydant.	Sans action à la dose de 50 mg par l.
Eau oxygénée	Oxydant.	Employée en cours de fermentation, légère action retardatrice.
Hydroxyquinoléine (Bisulfite ou sulfate.....	Antiseptique, fongicide.	20 mg par l retardent de 5 jours le départ de la fermentation ; 50 mg l'inhibent.
Ions Ag (73)	Antiseptique.	Ne peuvent empêcher complètement la fermentation d'un moût ou d'un vin, mais les rendent moins fermentescibles.
Isosulfocyanate d'allyle (74)	Antiseptique.	10 mg par l inhibent la fermentation du moût ; 2 mg interdisent la fermentation d'un vin.
Paraoxybenzoate de Na.	Antiseptique.	500 mg par l n'empêchent pas la fermentation du moût et ne suffisent pas à stabiliser le vin.
Parachlorobenzoate de Na	Antiseptique.	100 mg par l inhibent la fermentation du moût et 50 mg celle du vin.
Réductone (75).....	Réducteur.	A la dose de 50 mg par l retarde de quelques heures la fermentation du moût.
Uracile (76)		Aucun effet sur la fermentation du moût.
Vitamine K_5 (77).....	Fongicide.	Retarde considérablement le départ de la fermentation du moût (20 mg par l d'une huitaine de jours) : 10 à 15 mg empêchent la fermentation du vin.

nous opérions avec un moût de 200 g de sucre par litre et un vin de 10° d'alcool et 25 g de sucres réducteurs, désulfité au préalable par la quan-

tité juste nécessaire d'éthanal. Le vin et le moût étaient placés à l'étuve à 25°C en flacons incomplètement pleins, après avoir été ensemencés par un levain en activité. Nous rassemblons dans le tableau XII, les résultats obtenus pour un certain nombre de produits.

L'azothydrate de sodium, l'isosulfocyanate d'allyle, l'acide monobromacétique, l'hydroxyquinoléine, le p-chlorobenzoate de sodium, ont provoqué des inhibitions totales. Cependant ces produits sont ou toxiques, ou doués d'odeur désagréable, ou bien actifs seulement à des concentrations très élevées de l'ordre de 1/10 000, tandis que les antibiotiques antifongiques étudiés au chapitre VII nous donneront des exemples de corps actifs, au 1/1 000 000 et même au 1/10 000 000.

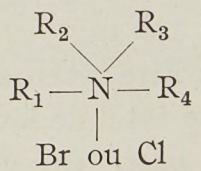
La vitamine K_5 (chlorhydrate de 2-méthyl 4-amino 1-naphtol), incapable d'empêcher complètement la fermentation d'un moût de raisin, peut assurer une bonne protection des vins sucrés. L'absence complète de toxicité de la vitamine K_5 lui a permis d'être proposée à titre de conservateur des aliments et des boissons. Ajoutons que 5 mg par litre empêchent radicalement le développement des bactéries acétiques et l'acétification du vin.

III. — Essai des sulfamides sur les levures

Nous avons essayé de nombreuses sulfamides dans leur action sur les levures de vin : acide p-aminosalicylique, sulfanilamide, sulfanylthiourée, sulfathiazol, sulfamérazine, sulfadiazine, p-aminophénylsulfonylguanidine, sulfapyridine, etc. Certains de ces produits retardent un peu la fermentation, mais aucun ne manifeste une action inhibitrice digne d'intérêt. Cela se conçoit très bien après l'étude des facteurs de croissance des levures. On sait que les sulfamides agissent comme antivitamines de l'acide p-aminobenzoïque. Or ce facteur de croissance n'ayant montré aucune influence accélératrice sur la multiplication des levures de vin, il est logique que les sulfamides ne possèdent aucune action inhibitrice sur ces mêmes levures.

IV. — Essai des sels d'ammonium quaternaire

Les sels d'ammonium quaternaire sont des produits azotés synthétisés à partir du chlorure d'ammonium en substituant à un atome d'hydrogène de la molécule un radical organique. La formule générale est la suivante :



Lorsque deux au moins de ces radicaux comportent une longue chaîne carbonée ou un cycle, surtout s'ils sont non saturés, la substance possède des propriétés antiseptiques. Le nombre des sels d'ammonium quaternaire est maintenant considérable. Solubles dans l'eau, les alcools et autres solvants, d'un pouvoir mouillant très élevé, ils sont relativement stables vis-à-vis des agents chimiques et de la chaleur. Toutefois, ils sont incompatibles avec la plupart des matières organiques. Les protéines par exemple, peuvent neutraliser leur action en formant avec eux des combinaisons complexes. Aux doses normales d'emploi, en général faibles, leur toxicité est nulle. Leur désavantage est de faire mousser fortement les liquides qui les contiennent même en très faible proportion.

a) **Expérimentation des sels d'ammonium quaternaire sur la fermentation.** — Nous avons essayé l'action sur les levures d'un certain nombre de sels d'ammonium quaternaire. Nous les donnons dès maintenant par ordre décroissant d'activité :

1. — Bromure de décyldiméthylammonium.
2. — Bromure de lauryldiméthylbenzylammonium.
3. — Bromure de triméthylalkylammonium.
4. — Chlorure d'alcoyldiméthylbenzylammonium.
5. — Chlorure d'alkyldiméthylbenzylammonium.
6. — Bromure de cétyltriméthylammonium.
7. — Chlorure de cétyldiméthylbenzylammonium.
8. — Bromure de cétyldiméthylcyclohexanolammonium.
9. — Chlorure de lauryldiéthylbenzylammonium.

Les fermentations ont été conduites avec une levure elliptique et avec une *Kloeckera apiculata*. La marche des fermentations est suivie par dosage du sucre et numération des levures. Les résultats sont exposés dans les tableaux XIII et XIV.

De ces essais, nous pouvons tirer les conclusions suivantes :

1° Tous les sels d'ammonium quaternaire agissent sur les levures et retardent la fermentation sans pouvoir, même à dose forte, l'inhiber complètement dans le moût de raisin. Ils ne réussissent qu'à prolonger la phase de latence. La diminution du nombre de cellules de levures est inférieure à 35 p. 100.

Si l'on prend l'exemple du produit n° 1, le plus efficace, on voit qu'au treizième jour d'une fermentation anaérobie, le retard par rapport au témoin est de 27 g de sucre avec 10 mg par litre de produit, de 30 g avec 20 mg et de 125 g avec 50 et 100 mg.

L'addition de 100 mg par litre retarde de 10 jours environ le départ de la fermentation. Le nombre total de levures déterminé un mois après l'ensemencement, lorsque le sucre est complètement transformé, est

diminué par rapport au témoin respectivement de 6 p. 100 pour les deux premières doses et 12 et 21 p. 100 pour les deux autres.

Cependant, les levures apiculées sont plus sensibles que les levures elliptiques. En fin de fermentation avec 20 mg par litre du produit n° 1 il reste dans le milieu 33 g de sucre non transformé par ces levures, de plus que dans le témoin et le nombre de levures apiculées est diminué de 58 p. 100.

Tableau XIII

Action du bromure de décyldiméthylammonium sur Saccharomyces ellipsoïdeus et Kloeckera apiculata

Moût de 200 g de sucre fermentant à 25° à l'abri de l'air.
Sucre fermenté en grammes, nombre de levures en milliers par mm³.

			4 jours	8 jours	11 jours	16 jours
Saccharomyces ellipsoïdeus	Témoin	Sucre fermenté	34	92	165	195
		Nombre de levures	*38*	*42*	*46*	
	+ 10 mg	Sucre fermenté	15	65	129	193
		Nombre de levures	*5*	*35*	*39*	*43*
	+ 20 mg	Sucre fermenté		15	89	191
		Nombre de levures		*13*	*33*	*44*
	+ 50 mg	Sucre fermenté			75	177
		Nombre de levures			*21*	*39*
	+ 100 mg	Sucre fermenté			81	186
		Nombre de levures			*21*	*35*
Kloeckera apiculata.	Témoin	Sucre fermenté	41	80	95	95
		Nombre de levures	*11*	*23*	*24*	
	+ 10 mg	Sucre fermenté	41	62	66	66
		Nombre de levures	*12*	*13*	*14*	
	+ 20 mg	Sucre fermenté	27	47	58	62
		Nombre de levures	*4*	*7*	*10*	

2° Le pouvoir inhibiteur développé n'est pas proportionnel à la dose de produit introduite : 100 mg par litre n'ont parfois pas plus d'effet sur les levures elliptiques que 10 mg. Au dixième jour d'une fermentation par exemple, les retards par rapport au témoin sont respectivement de 71 g, 71 g, 100 g et 113 g de sucre par litre pour des doses de 10, 20, 50 et 100 mg de produit n° 1.

3° Par comparaison entre les produits n° 2 et n° 9 on peut conclure que dans la molécule d'un sel d'ammonium quaternaire, le groupe diéthyl est beaucoup moins actif que le groupe diméthyl. De même, en comparant les produits n° 3 et 4 et 7 et 8, on voit que le remplacement d'un groupe méthyl par un groupe benzyl s'accompagne de la perte d'une certaine activité, de même que le remplacement du groupe benzyl par un groupe cyclohexanol.

TABLEAU XIV

Influence de divers sels d'ammonium quaternaire sur la fermentation alcoolique

Sur moût de raisin de 200 g de sucre.

	Départ de la fermentation au *nème* jour	Durée de la fermentation en jours	Population finale en milliers par mm³
Témoin	2	13	46
Bromure de décyldiméthylammonium			
10 mg	5	13	43
20 mg	7	13	44
50 mg	10	20	39
100 mg	10	20	35
Bromure de lauryldiméthylbenzylammonium			
10 mg	5	17	45
20 mg	5	17	40
Bromure de triméthylalkylammonium			
10 mg	5	17	44
20 mg	5	17	40
Chlorure d'alcoyldiméthylbenzylammonium			
10 mg	5	17	40
20 mg	5	17	41
50 mg	7	20	39
100 mg	8	30	37
Chlorure d'alkyldiméthylbenzylammonium			
10 mg	5	13	44
20 mg	5	19	43
50 mg	7	30	39
100 mg	7	30	38
Bromure de cétyltriméthylammonium			
10 mg	4	10	42
20 mg	5	12	40
Chlorure de diméthylbenzylammonium			
10 mg	4	10	43
20 mg	5	13	43
Bromure de triméthylalkylammonium			
10 mg	4	12	37
20 mg	5	14	37
Bromure de cétyldiméthylcyclohexanolammonium			
10 mg	4	9	45
20 mg	4	9	40
Chlorure de lauryldiéthylbenzylammonium			
10 mg	5	17	42
20 mg	7	30	40
50 mg	7	30	39
100 mg	7	> 30	38

b) **Mode d'action des sels d'ammonium quaternaire.** — Le mode d'action de ces produits a été discuté. On peut penser qu'en vertu de leurs propriétés tensioactives, ils exercent sur la levure une action de surface. Ceci permettrait d'expliquer le fait de la non-proportionnalité de leur action en fonction de la dose utilisée. Ils opèrent davantage comme fongistatiques que comme fongicides vis-à-vis des levures. Celles-ci par-

viennent, après une période plus ou moins prolongée, à neutraliser totalement l'inhibition. Vraisemblablement l'action des sels d'ammonium quaternaire est gênée dans le moût par les protéines. Quoiqu'il en soit, le pouvoir antiseptique des sels d'ammonium quaternaire, très fort sur d'autres microorganismes tels que les bactéries acétiques, est relativement peu marqué sur les levures de vins. On ne peut songer à les utiliser pour le mutage ou la conservation des vins doux.

V. — Découverte de produits très actifs sur les levures parmi les antifongiques de synthèse

La recherche systématique de l'action sur les levures d'un grand nombre de substances, nous a mis sur la voie de produits qui se sont montrés particulièrement efficaces et qui finalement peuvent se classer parmi les inhibiteurs les plus puissants de la fermentation alcoolique. Ces produits appartiennent au groupe des antifongiques de synthèse,

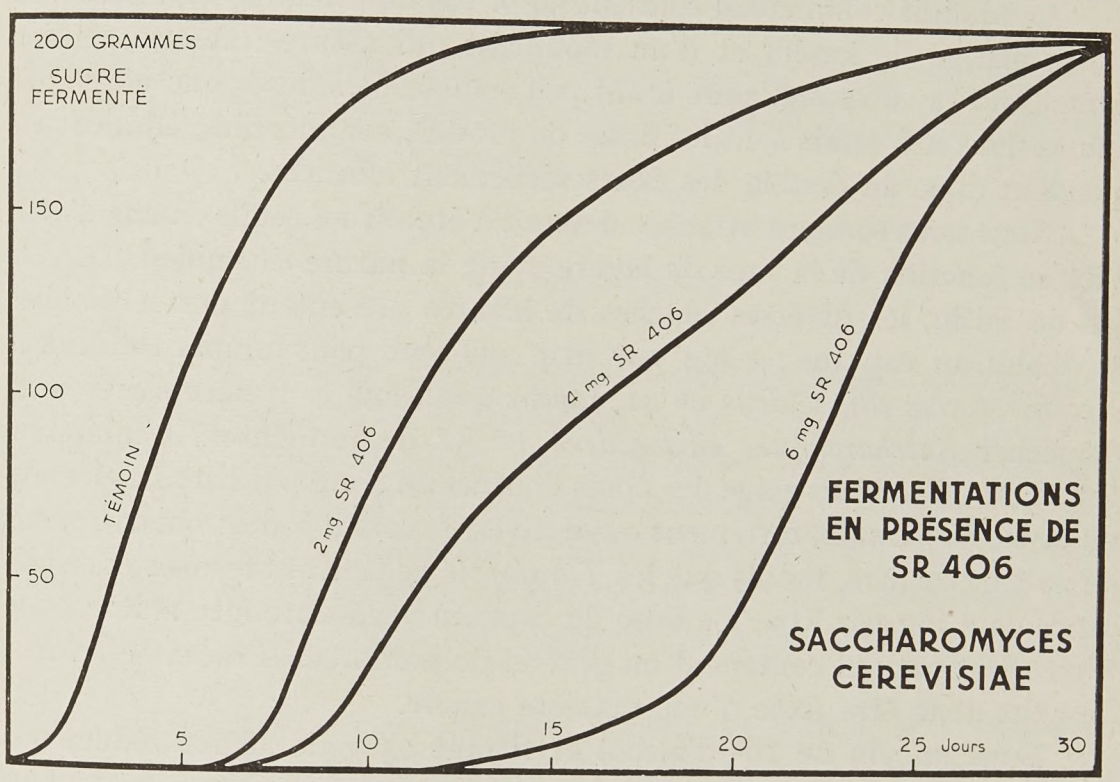
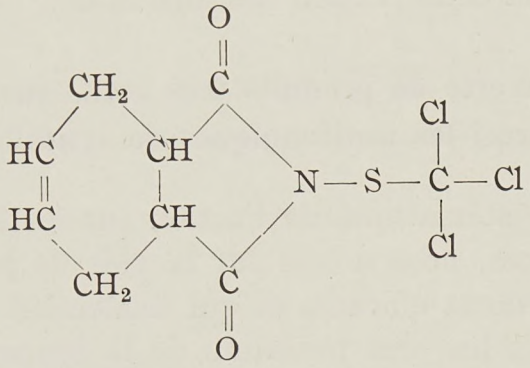


FIG. 11

utilisés pour les traitements anticryptogamiques des arbres fruitiers et de la vigne. Ce sont les 2,3-dichloro 1,4-naphtaquinone et la trichlorométhylthiotétrahydrophtalimide (78). Ces deux substances agissent à peu près aux mêmes doses, mais la seconde semble dans le moût et le vin d'une stabilité un peu meilleure. 7 à 8 mg par litre interdisent la fermentation du moût de raisin pendant un délai assez long (fig. 11), 30 à 50 mg par litre sont capables d'arrêter une fermentation en pleine acti-

vité, enfin des doses de l'ordre du milligramme ou même, suivant les levures, inférieures à cette concentration, empêchent la refermentation du vin pendant un mois et 5 mg pendant plusieurs mois.

Notre étude portera ici surtout sur la trichlorométhylthiotétrahydrophtalimide, commercialisée sous le nom de S.R. 406 ou « Captane ». Sa formule est la suivante :



Le produit commercial contient 50 p. 100 de produit pur, additionné d'une charge de kaolin et d'un mouillant qui assure une suspension homogène, la substance pure étant peu soluble. Les doses que nous indiquons dans nos essais sont les doses de produit commercial ; elles correspondent donc au double des doses réellement efficaces.

Nous nous sommes attachés d'abord à établir les seuils exacts d'activité en fonction de la race de levure et de la nature du milieu. Dans le jus de raisin, les diverses souches de levures présentent des sensibilités variables au captane : 2 mg par litre suffisent pour inhiber totalement *Saccharomyces ellipsoïdeus* n° 41, tandis que 8 mg sont nécessaires pour empêcher *Saccharomyces ellipsoïdeus* n° 51 de fermenter. L'inhibition totale des *Kloeckeras* exige des doses voisines de 5 mg par litre Les levures du genre *Hansenula*, fortement oxydatives, résistent à des concentrations de 20 mg par litre, tandis que les *Torulopsis* ne peuvent fermenter en présence de 2 mg par litre. La dose de captane nécessaire à la stabilisation d'un moût naturel contenant en général de nombreuses races de levures, ne peut donc être fixée d'une manière exacte.

Dans un vin de 10° d'alcool et titrant 25 g de sucres réducteurs, ensemencé avec des levures elliptiques, les quantités minima de captane interdisant la refermentation varient suivant les souches de 0,2 à 0,5 mg par litre, tant qu'on ne prolonge pas l'expérience plus d'un mois et qu'on ne renouvelle pas l'ensemencement. En effet, le produit manque de stabilité lorsqu'il est ajouté au vin et il perd progressivement son efficacité.

Dans le vin, le produit est en partie détruit par un chauffage ; il est oxydable au contact de l'air, il est sensible à la lumière, ainsi que l'ont montré des essais de stabilité sur bandelettes de papier-filtre (79). Il se combine à l'éthanal avec une perte de son pouvoir antiseptique.

Le gaz sulfureux, par contre, provoque la réaction inverse. Il tend à stabiliser le produit et augmente nettement son action inhibitrice. La combinaison, vraisemblablement une réaction d'addition est immédiate ; elle s'extériorise par une augmentation de l'odeur de mercaptan du produit. 50 mg d'acide sulfureux par litre donnent très peu d'odeur à de l'eau distillée, de même que 20 mg de captane, mais si l'on ajoute simultanément les deux produits, l'odeur dégagée est très forte.

D'autre part, ajouté à la dose de 0,5 mg par litre à des vins doux ensemencés avec *Saccharomyces ellipsoïdeus* n° 51, sous la forme de suspension dans une solution de bisulfite ou de gaz sulfureux, la fermentation a été interdite pendant 6 mois et sans doute l'était-elle définitivement. Cependant, les quantités de SO_2 ainsi introduites étaient négligeables et ne dépassaient pas 10 mg par litre.

Le produit n'est pas toxique : la toxicité aiguë par ingestion dépasse 15 g par kg. L'inconvénient de ce produit est qu'il n'est pas facilement dosable aux doses d'emploi ; une méthode colorimétrique a été donnée (80).

L'action du captane sur les levures a été, de même, signalée par ROUBERT (81) et récemment étudiée par CORDONNIER (82), qui insistent sur la faible stabilité du produit.

VI. — Conclusions

Le gaz sulfureux, même employé rationnellement dans la pratique de la vinification et de la conservation des vins, ne peut être considéré comme l'antiseptique idéal. Aux plus fortes doses tolérées, il ne peut empêcher la fermentation que momentanément. Ses affinités chimiques pour les fonctions aldéhyde et cétone, font qu'il est neutralisé dans le vin par un grand nombre de substances d'où, pour maintenir une dose active très faible, obligation d'utiliser des quantités 10 à 20 fois plus fortes.

D'autre part, parmi les antiseptiques classiques, nous trouvons des produits très actifs, stables, mais toxiques. Les sels d'ammonium quaternaire se classent parmi les inhibiteurs faibles.

La trichlorométhylthiotétrahydrophtalimide agit fortement à des concentrations peu élevées. Sa compatibilité avec l'anhydride sulfureux, son manque de toxicité pourraient en faire un bon stabilisateur des vins doux, toutes questions de réglementation mises à part, s'il était possible par ailleurs de confirmer sa stabilité, souvent insuffisante, et de contrôler sa dose d'emploi par un dosage facile.

CHAPITRE VII

ACTION DES ANTIBIOTIQUES ANTIFONGIQUES SUR LES LEVURES

Depuis la découverte des premiers antibiotiques (pénicilline, streptomycine, chloromycétine), une prospection systématique a été entreprise concernant les produits de la sécrétion de toutes les moisissures connues, identifiées ou non. A ce jour, le nombre des antibiotiques isolés est tel que récemment, par exemple, faisant la revue des antibiotiques dûs aux seuls actinomycètes, BENEDICT (83) a rédigé un véritable dictionnaire où ces substances sont classées par ordre alphabétique. A leur début, les recherches étaient dirigées dans le but de lutter contre les microorganismes pathogènes, en vue d'applications thérapeutiques. Les activités technologiques peuvent également tirer bénéfice de ces découvertes. Ainsi, parmi les premiers antibiotiques antifongiques isolés pour combattre les champignons pathogènes, certains peuvent trouver une utilisation dans les industries alimentaires ou les industries de fermentation.

Nous passons en revue dans ce chapitre, les nombreuses observations signalant un antagonisme entre levures et autres microorganismes, et nous donnons un compte-rendu des recherches que nous avons nous-mêmes entreprises, sur l'action des antibiotiques sur les levures.

I. — Isoantagonisme

Si la découverte des antibiotiques est récente, des phénomènes d'antibiose et d'antagonisme avaient été observés depuis longtemps. On relève de nombreuses observations se rapportant aux levures.

Dès 1900, LEBEDEFF (84) signale la formation par les levures de substances toxiques pour leurs propres cellules. En 1909, HAYDUCK montre, dans des essais repris un peu plus tard par FERNBACH (85), qu'en laissant macérer pendant quelques heures dans une solution d'acide chlorhydrique à 1 g par litre, de la levure de boulangerie séchée au préalable à 37°, on obtient un liquide antiseptique pour les levures ; il détruit rapidement *Schizosaccharomyces pombe* et *Saccharomyces cerevisiae* et lyse en peu de temps *Bacterium coli* et les staphylocoques. Cette substance passe à travers les filtres, est entraînée par la vapeur d'eau lorsqu'on distille à basse pression à température inférieure à 40°, mais ne résiste pas à un chauffage à 100° C. FERNBACH note d'ailleurs que les propriétés bactéricides de la levure sont connues depuis longtemps et utilisées empiriquement en thérapeutique.

L'isoantagonisme des levures est un fait bien acquis dans la pratique des fermentations. D'après LEBEDEFF, déjà cité, lorsque les conditions expérimentales sont défavorables et particulièrement lorsque l'aération est insuffisante et la température trop élevée, la levure sécrète des produits qui inhibent son propre développement. BOULARD (86) observe à nouveau le phénomène et propose même « un procédé permettant d'arrêter à volonté les fermentations à n'importe quel moment » au moyen de chauffages et d'ensemencements successifs. D'une façon analogue, MALVEZIN (87) aurait obtenu un « vaccin biologique » susceptible de préserver les vins de toute refermentation.

Pour Ferré (88), les difficultés et accidents de fermentation seraient dûs simplement à un degré alcoolique trop élevé et l'auteur conteste dans ces cas l'intervention d'une production de toxine ou même d'une carence vitaminique.

Cependant, RIBÉREAU-GAYON et ses collaborateurs (89) ont montré que la refermentation d'un milieu dépend pour beaucoup des conditions dans lesquelles s'est développée la première fermentation. Lorsque celle-ci s'est effectuée en anaérobiose totale ou en présence d'une teneur en sucre trop élevée, la croissance des levures dans le milieu est très difficile. On a pu constater d'autre part que certaines levures dextrogyres de Sauternes empêchent le développement d'autres levures dans les milieux qu'elles ont fermentés partiellement. En outre, tous ceux qui ont utilisé l'eau de levure comme milieu de culture savent que, si la dilution n'est pas suffisante, le milieu est moins fermentescible.

II. — Antagonisme levures-bactéries et levures-champignons

L'antagonisme des levures s'exerce aussi sur d'autres organismes. D'après SCHILLER, des levures cultivées en milieu dépourvu d'azote, acquièrent des propriétés lytiques. WASKSMAN (90) cite les cas d'une *Torulaspora utilis* qui inhibe diverses bactéries gram-négatives et d'une *Rhodotorula* qui élabore une substance thermostable antagoniste d'*Aspergillus niger* et à un degré moindre d'*Aspergillus oryzae*. COOK (91) et ses collaborateurs ont isolé des cellules de levures, une substance active contre les moisissures et les bactéries. De même SEIGNEURIN et ses collaborateurs (92) ont extrait de la levure de bière et des bactéries acétiques des substances cristallisées qui inhibent les bactéries gram-positives et gram-négatives.

Des observations extrêmement importantes pour la pratique de la brasserie ont été faites récemment par KOCH et CLEMENT (93). Le pouvoir antibiotique de 145 souches de levures de bière, de vin, de distillerie et de boulangerie, a été examiné par la méthode des zones d'inhibition sur

plaques nutritives, vis-à-vis de *Bacillus subtilis*, de *Bacterium prodigiosium* et des pédiocoques responsables des troubles de la bière. Toutes les races de levures de bière, hautes et basses, et toutes levures de distillerie et de boulangerie à une exception près, inhibent plus ou moins le développement de ces microorganismes, certaines avec une grande intensité. Par contre, les levures de vin se montrent peu actives à ce point de vue. L'effet d'antibiose a été de même constaté en milieu liquide et le filtrat stérile de levures actives est efficace. Le chauffage à 100°C détruit les substances actives.

III. — Microorganismes producteurs de substances antifongiques et antilevures

Inversement, nombreux sont les champignons et bactéries doués d'un pouvoir anti-levure. D'après KOPACZEWSKI (94), *Pseudomonas aeruginosa* et *Bacillus anthracis* seraient antagonistes de *Saccharomyces cerevisiae*. D'après WAKSMAN, il en serait de même de *Pseudomonas fluorescens* vis-à-vis de *Saccharomyces ellipsoïdeus* et *Saccharomyces pastorianus*. L'acide aspergillique sécrété par plusieurs souches de *Penicillium* et par *Aspergillus ochraceus*, se montre légèrement actif contre les levures, de même que la tyrothricine et la patuline dont l'une est due à *Bacillus brevis*, l'autre à *Penicillium patulatum*. SOBELS (95) cite l'action antibiotique de quelques myxomycètes sur *Saccharomyces cerevisiae*. Les travaux de MULLER-THURGAU (96) repris par MICHEL (97) et par SCHANDERL (98), portant sur l'antagonisme d'*Aspergillus niger*, de *Penicillium glaucum* et de *Botrytis cinerea* vis-à-vis des levures, ont servi de base à notre étude sur la formation par *Botrytis cinerea* de substances anti-levures dans les jus de raisins « pourris noble » (chapitre VIII). C'est parmi les *Streptomyces* surtout que l'on trouve le plus grand nombre de producteurs d'antibiotiques antifongiques susceptibles d'inhiber les levures. 56 p. 100 des souches de Streptomyces ont des propriétés antifongiques, d'après ALEXOPOULOS (99). En 1951 au Japon, KASUYOSHI AISO (100) avait caractérisé parmi 400 souches d'actinomyces, 240 ayant des propriétés antifongiques ou antilevures susceptibles d'applications dans les industries alimentaires.

WAKSMAN (101) a classé en trois groupes les antibiotiques d'après leur spectre antimicrobien :

1° Les antibiotiques capables d'agir plus ou moins fortement sur la croissance des bactéries, des levures et des champignons, tels la gliotoxine, la patuline, l'actinomycine, la tyrothricine, la streptothricine, etc.

2° Les antibiotiques actifs sur quelques bactéries et sur les actinomyces, mais inactifs sur les champignons et les levures, tels la pénicilline, la streptomycine, le chloramphénicol, l'auréomycine, la terramycine, etc...

3° Les antibiotiques actifs sur les champignons et quelques levures, et peu ou pas actifs sur les bactéries, tels l'actidione, l'antimycine, la mycosubtiline, la fradicine, etc.

IV. — Action des antibiotiques des premier et deuxième groupes

Nous avons étudié (102) l'action sur la fermentation alcoolique du moût de raisin ensemencé de levures en culture pure, d'un certain nombre d'antibiotiques appartenant à chacune des trois classes. Seuls ceux du troisième groupe ont été réellement efficaces. Mais étant donné l'étendue du spectre antimicrobien de chaque antibiotique, il était intéressant d'examiner l'action, sur les levures de vin, des antibiotiques des autres groupes.

Le protocole des essais reste le même que précédemment. On estime le pouvoir inhibiteur de l'antibiotique à étudier en comparant la marche de la fermentation du jus de raisin en sa présence, à celle de la fermentation du même moût témoin, par dosage du sucre et numération des levures. Les essais sont menés à la température de 25°C, dans les deux conditions habituelles d'aération.

Nous avons étudié les antibiotiques suivants ; nous indiquons l'agent producteur de l'antibiotique.

Premier groupe

Tyrothricine	*Bacillus brevis*
Patuline	*Penicillium patulatum*
Actinomycine	*Streptomyces antibioticus*
Notatine	*Penicillium notatum*

Deuxième groupe

Pénicilline G	*Penicillium notatum*
Auréomycine (chlorhydrate)	*Streptomyces aureofaciens*
Didromycine (sulfate de déhydrostreptomycine)	*Streptomyces griseus*
Chloramphénicol (chloromycétine)	Produit de synthèse
Subtiline	*Bacillus subtilis*
Bacitracine	*Bacillus subtilis*
Néomycine	*Streptomyces fradiae*
Terramycine	*Streptomyces rimosus*
Baccatine (103)	*Gilberella baccata*
Acide kojique	*Aspergillus oryzae*

On trouvera ailleurs le détail des résultats expérimentaux (102).

Ajoutés aux doses de 10, 20, 50 et 100 mg par litre, quelles que soient

les conditions d'aération, la pénicilline, l'auréomycine, la didromycine, le chloramphénicol, la bacitracine, la néomycine, la terramycine, la baccatine, l'acide kojique ne modifient pas notablement la vitesse de la fermentation. Toutefois, à la concentration de 50 mg par litre, ces antibiotiques diminuent sensiblement la population levurienne totale. Celle-ci est diminuée de 10 p. 100 par la pénicilline, 20 p. 100 par l'auréomycine et la néomycine, et 32 p. 100 par la didromycine. Le chloramphénicol à l'abri de l'air abaisse de 40 p. 100 le nombre des levures.

La patuline à la dose de 100 mg par litre retarde de un à deux jours le départ de la fermentation et diminue de 35 p. 100 la population de levures. La tyrothricine, à 50 mg par litre, parvient au sixième jour de la fermentation à retarder celle-ci de 44 g de sucre à l'air et de 71 g à l'abri de l'air. Elle réduit en outre de moitié le nombre final de levures. Elle se distingue de la plupart des antibiotiques faibles, capables seulement de freiner la fermentation dans ses premières phases par le fait que son action se manifeste surtout, non dans les débuts, mais dans le cours de la fermentation. L'actinomycine (ou soframycine) se montre moins active que la tyrothricine sur la fermentation, mais aussi efficace sur la croissance cellulaire. La notatine est pratiquement inopérante. Toutes ces substances, plus antibactériennes qu'antifongiques, n'exercent sur les levures de vin une action inhibitrice sensible qu'à des doses trop considérables pour qu'elles puissent faire l'objet d'applications technologiques.

V. — Action des antibiotiques du troisième groupe

Le tableau XV rassemble une liste des antibiotiques connus pour leurs propriétés antifongiques.

Parmi les antibiotiques antifongiques qu'il nous a été possible d'étudier, nous nous étendrons plus particulièrement sur l'actidione, la mycosubtiline, l'antimycine A, la candicidine et deux antibiotiques anglais : A 228 et A 432.

a) **Actidione.** — C'est un sous-produit de la fabrication de la streptomycine, dû à *Streptomyces griseus*. Whiffen et Bohonos (104) observant que le bouillon de culture de cet organisme inhibait le champignon pathogène *Cryptococcus neoformans*, contrairement à la streptomycine, pensèrent qu'il contenait un deuxième antibiotique. Par extraction au chloroforme et purification, ils obtinrent une substance cristallisée que ses propriétés chimiques et son spectre antibiotique distinguent nettement de la streptomycine.

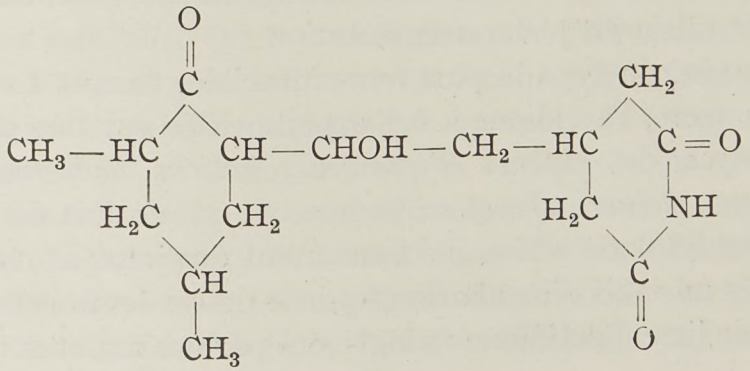
L'actidione est soluble par vive agitation dans l'eau (2 p. 100), très soluble dans le chloroforme, l'alcool et l'éther. Les solutions aqueuses se conservent pendant plusieurs semaines à la glacière à des pH compris

Tableau XV

Documentation sur quelques antibiotiques antifongiques

Désignation de l'antibiotique	Microorganisme producteur	Auteurs
Abikoviromycine	*S. rubescens* et *S. abikoensum.*	Umezawa, 1951 (83).
Actidione	*Streptomyces griseus.*	Whiffen, Bohonos et Emerson, 1946 (104).
Actinomycine	*Streptomyces antibioticus.*	Waksman et Woodruff, 1940 (83).
Actinone	*Streptomyces sp.*	Ikeda, 1950 (83).
Acide alternarique	*Alternaria solani.*	Brian et coll., 1951 (105).
Antibiotique 136	*Streptomyces lavendulae.*	Bohonos et coll., 1947 (83).
Antibiotique n° 1050	Champignon n° 1050 (Station Centrale Pathologie Végétale, Versailles).	Flanzy et Dupuy, 1952 (106).
Antimycine A	*Streptomyces sp.*	Strong et coll., 1949 (107).
Ascosine	*Streptomyces canescus.*	Hickey et coll., 1952 (108).
Cardicine	*Nocardia.*	Machlowitz, 1952 (83).
Candicidine	*Streptomyces sp.*	Waksman et coll., 1952 (109).
C. 381 et C. 135	*Streptomyces sp.*	Waksman et coll., 1952 (95).
Endomycine	*Streptomyces endus.*	Gottlieb, 1950 (110).
Flavacide	*Streptomyces voisin de S. glavus.*	Takahashi, 1952 (83).
Fradicine	*Streptomyces fradiae.*	Swart, Romano et Waksman, 1950 (111).
Fungicidine	*Streptomyces sp.*	Hazen et Brown, 1951 (112).
Gliotoxine	*Trichoderma viride.*	Brian, 1944 (113).
Glutinosine	*Metarrhizium glutinosum.*	Brian et coll., 1947 (114).
Griseofulvine	*Penicillium janczenski.*	Brian, 1949 (115).
Microcine A et B	*Micromonospora* non identifié.	Taira et Fuju, 1952 (83).
Moldine	*Streptomyces phaecochromogenus.*	Maeda et coll., 1952 (116).
Musarine	*Streptomyces non identifié.*	Thaysen et Butlin, 1948 (83).
Myceline	*Streptomyces roseoflavus.*	Aiso et coll., 1952 (83).
Mycosubtiline	*Bacillus subtilis.*	Walton et Woodruff, 1949 (117).
Nigericine	*Streptomyces nigri.*	Harned, 1951 (83).
Phaeofacine	*Strepto. phaeofaciens.*	Maeda et coll., 1952 (116).
Pléodicine	*Streptomyces* n° 272.	Chamey, 1952 (83).
Prodigiosine	*Bacillus prodigiosus.*	Lack, 1949 (118).
Rimocidine	*Streptomyces rimosus.*	Davisson, 1951 (119).
Rotaventine	*Streptomyces reticuli.*	S. Hosoya et coll., 1952 (120).
Thiaurine	*Streptomyces* non identifié.	Bolhofer et coll., 1952 (83).
Thiolutine	*Streptomyces albus.*	Celmer et Tanner, 1952 (83).
Trichomycine	*Streptomyces* H 2609.	Hosoya, 1952 (83).
Trichothécine	*Trichothecium raseum.*	Freeman et Morrison, 1949 (121).
Viridine	*Trichoderma viride.*	Brian et coll., 1946 (122).

entre 3 et 5. La substance est rapidement détruite en milieu alcalin. Sa formule chimique, tout d'abord étudiée par Ford et Leach (123) a été définitivement établie en 1949 (124) :



L'actidione exerce une action inhibitrice très puissante (125) sur certaines levures, mais très faible ou nulle sur les bactéries. En outre, son effet antilevure est spécifique de certains genres : si 0,17 mg par litre suffisent, d'après WHIFFEN, pour inhiber certains *Saccharomyces cerevisiae*, les levures du type *Kl. apiculata* ne sont pas gênées par des doses de l'ordre de 100 mg par litre et davantage. Les bactéries supportent des concentrations de 1 g par litre.

Nos essais ont été réalisés avec quatre produits différents : une actidione cristallisée de point de fusion 116°, fournie par la Upjohn Company (Kalamazoo), préparée avec la souche de *Streptomyces griseus* de WHIFFEN ; un second produit préparé par un laboratoire français, différent du premier par son état de pureté (mélange de 30 p. 100 d'actidione active avec 70 p. 100 d'isoactidione non active) ; un troisième dénommé antifongique 191, et enfin, nous avons essayé les bouillons bruts de culture de *Streptomyces griseus* eux-mêmes.

Nous avons cherché à établir le seuil d'efficacité dans les moûts selon les races de levures et dans les vins selon leur composition, la possibilité de mutage, la stabilité du produit dans les milieux qu'il doit protéger, et vis-à-vis de l'acide sulfureux. Nos chiffres sont donnés en poids d'actidione pure.

Dans les moûts de raisin, avec des ensemencements faibles, mais réalisés au moyen de levain en pleine activité, surtout les levures du type *Saccharomyces cerevisiae* se montrent sensibles à l'actidione : 0,5 mg par litre retarde de deux jours le départ de la fermentation, 1 à 4 mg par litre, de cinq jours. En présence de 5 mg par litre, la fermentation s'amorce dix jours après l'ensemencement, se poursuit à une vitesse très ralentie (1 g de sucre fermenté par jour) et reste incomplète. 10 mg empêchent toute fermentation. Cette concentration suffit aussi pour inhiber les levures des genres *Torulaspora rosei* et *Hansenula*. Par contre, une *Kl. apiculata* a résisté à 200 mg par litre d'actidione.

On constate que cet antibiotique exerce une influence prépondérante sur les levures se développant à l'abri de l'air. Il semble agir peu sur les mécanismes respiratoires et essentiellement sur les processus de la fermentation alcoolique (126). Cependant, l'actidione est incapable d'arrêter une fermentation en marche : elle est absolument sans effet sur les levures d'un moût de raisin en pleine fermentation

Dans un vin, du type le plus fermentescible, titrant 10° d'alcool et 1° Baumé en sucre, l'actidione a été expérimentée sur une cinquantaine de *Saccharomyces* des espèces *ellipsoïdeus, italicus, oviformis, carlsbergensis, bayanus, steineri, chevalieri* et *uvarum*, provenant de divers pays vinicoles. Tous les flacons témoins fermentent dix jours après l'ensemencement. Après un mois d'incubation, quinze de ces levures sont inhibées par 0,1 mg par litre d'actidione ; vingt-neuf par 0,2 mg et six par 0,3 mg

par litre. En outre, l'efficacité de l'antibiotique croît avec le degré alcoolique du vin : pour une même levure dont l'inhibition totale exige 0,2 mg par litre dans un vin de 10° d'alcool, 0,1 mg suffit si le vin titre 12° ou davantage.

D'autre part, nous avons essayé les bouillons bruts de culture de *Streptomyces griseus* qui contiennent d'après WHIFFEN, des quantités importantes d'actidione, de l'ordre de 200 mg par litre.

L'action de ces bouillons n'est pas absolument la même que celle de l'actidione. Alors que l'actidione utilisée à trop faible dose pour provoquer une inhibition complète, modifie la marche de la fermentation durant tout son cours, dans les mêmes conditions les bouillons de Streptomyces ne provoquent qu'une prolongation de la phase de latence : dès qu'elle est amorcée, la fermentation se poursuit normalement.

La richesse des bouillons est variable. Certains ont manifesté un pouvoir antibiotique correspondant à une concentration en actidione de près de 800 mg par litre. Les extraits obtenus par traitement des mycéliums de Streptomyces contiendraient jusqu'à 1 à 2 g d'antifongique, ce qui laisse penser qu'existent dans ces milieux d'autres antifongiques que l'actidione ou que, dans ces milieux bruts, son action est renforcée par un effet de synergisme, en présence d'autres produits.

b) **Mycosubtiline.** — Elle est produite en même temps que la subtiline par *Bacillus brevis*. Elle a été découverte par WALTON et WOODRUFF (117). Extraite par l'alcool des bouillons de culture, c'est une substance blanche, cristallisée, insoluble dans l'eau, soluble en milieu légèrement alcalin, dans l'alcool et dans divers solvants. Thermostable, elle résiste à un chauffage de 15 minutes à 120°. Son point de fusion est 256-257°C. C'est un polypeptide dont l'hydrolyse acide donne un mélange d'acides aminés, parmi lesquels ont été caractérisés l'acide aspartique et la proline.

Nous avons réalisé avec la mycosubtiline fournie par la firme Merck (Rahway, U. S. A), une série d'essais calqués sur le plan d'étude de l'actidione.

Dans un jus de raisin, l'action de l'antibiotique s'exerce avec des intensités variables selon la race de levure expérimentée. Les *Saccharomyces* y sont les plus sensibles. Quel que soit le mode d'aération du milieu, 2 à 3 mg par litre suffisent pour inhiber complètement leur fermentation. Les *Kloeckeras* et les *Torulopsis* supportent des doses de 5 mg par litre ; les *Hansenulas* résistent à 10 mg.

Comme l'actidione, la mycosubtiline agit peu sur la respiration des levures et essentiellement sur la fermentation. Comme elle encore, elle est sans effet sur les levures dans un moût en pleine fermentation.

Dans le vin, l'efficacité de la mycosubtiline n'est pas meilleure que

dans le moût. La stabilisation des vins exige des doses de cet antibiotique égales, parfois même supérieures à celles qui suffisent à inhiber ces mêmes organismes dans le jus de raisin.

c) **Antimycine A.** — Elle est produite par une souche de *Streptomyces* non identifiée. Sa découverte a été faite au laboratoire de Strong. Extraite par l'éther des milieux de culture c'est une substance blanche, soluble dans l'alcool et l'acétone, insoluble dans l'eau. Son point de fusion se situe aux environs de 140°C. Sa formule chimique est $C_{28}H_{40}O_9N_2$(127). On a attribué ses propriétés faiblement acides à la présence d'une fonction phénol dans la molécule. Très stable en solution alcoolique à la température ordinaire, l'antibiotique est détruit par chauffage en milieu alcalin.

A l'inverse de la mycosubtilline, l'action antifongique de l'antimycine A est considérable dans les milieux nutritifs simples et dans les vins, mais nulle dans les milieux contenant des substances organiques, et en particulier dans les jus de raisin. Si 0,5 mg par litre met un vin définitivement à l'abri de toute fermentation, 50 mg dans un moût de raisin ne parviennent pas à gêner les levures elliptiques.

Jusqu'à maintenant, la préparation de l'antimycine A n'a pas dépassé l'échelle du laboratoire. Une fabrication industrielle permettrait l'application de cet antibiotique à la conservation des vins sucrés. La plus remarquable propriété de ce conservateur serait d'être dépourvu de toxicité puisqu'il est détruit par la salive et le suc gastrique.

d) **Candicidine.** — Cet antibiotique a été isolé et préparé sous forme cristallisée dans les laboratoires de Waksman. Il exerce une forte action antifongique sur *Candida albicans*.

D'après nos essais, son action inhibitrice sur *Saccharomyces cerevisiae* est nettement inférieure à celle des antibiotiques précédemment étudiés. Une concentration de 10 mg par litre ne parvient qu'à retarder d'une quinzaine de jours le départ de la fermentation dans un jus de raisin. Une inhibition totale n'a pu être obtenue dans ce milieu ; elle nécessite 6 à 7 mg par litre dans le vin.

e) **Antibiotiques A 228 et A 432.** — Ces deux antibiotiques sont extraits de cultures de *Streptomyces* non identifiés. Ils sont doués de fortes propriétés fongicides et sont inefficaces contre les bactéries.

D'après nos essais, 7 à 8 mg par litre de A 228 interdisent la fermentation d'un moût de raisin et 3 mg celle du vin ; 30 mg par litre suffisent pour arrêter une fermentation en plein développement. C'est jusqu'ici, le seul des antibiotiques étudiés, susceptible d'agir efficacement sur les levures d'un moût en fermentation.

L'action de A 432 se rapproche de celle de la mycosubtiline. Cet antibiotique est aussi actif sur *Saccharomyces cerevisiae* dans le jus de raisin que dans le vin : 5 mg par litre sont nécessaires pour inhiber totalement ces levures dans ces deux milieux.

VI. — Conclusions

Le mode d'action des antibiotiques est à ce jour encore à peu près inconnu. Aucun rapport n'existe entre leur formule chimique, leur origine et leur spectre antimicrobien. Leurs propriétés inhibitrices vis-à-vis de certains microorganismes, bien établies dans un certain milieu, peuvent se trouver totalement changées lorsqu'on passe dans un autre. Toutefois, il est possible de tirer profit de cette spécificité même, qui est le caractère propre des antibiotiques, en favorisant un genre microbien aux dépens d'un autre.

L'actidione douée d'une action antilevure puissante sur certains genres, mais sans action sur d'autres, sans action non plus sur les bactéries, est un produit antibiotique, mais non abiotique. Son innocuité aux doses très faibles d'emploi (128), sa compatibilité avec l'acide sulfureux, sa spécificité vis-à-vis des *Saccharomyces* qui précisément sont seuls capables de provoquer la refermentation des vins sucrés, semblent la désigner comme un produit possible de substitution de l'acide sulfureux, ou tout au moins comme un adjuvant permettant de limiter les doses de cet antiseptique aux quantités strictement nécessaires à son rôle antioxygène. En tous cas la solution du problème de la stabilisation des vins sucrés paraît bien être dans cette voie, et grâce à la spécificité des antibiotiques, il est possible de concevoir un produit actif sur les levures à faible dose, et tout à fait inoffensif pour l'homme.

Chapitre VIII

FORMATION PAR BOTRYTIS CINEREA D'UN ANTIBIOTIQUE AGISSANT SUR LES LEVURES

Les moûts du Sauternais, issus de raisins envahis par la « pourriture noble », très riches en sucres réducteurs, fermentent en général lentement et difficilement. Ils doivent leurs caractéristiques de composition au *Botrytis cinerea*, champignon microscopique dont l'action physiologique sur les constituants du raisin s'accompagne d'une conséquence physique, la concentration par évaporation d'eau (129). D'une part, le Botrytis puise dans la baie les aliments azotés et hydrocarbonés et les facteurs de croissance qui lui sont nécessaires et y déverse les produits de son

métabolisme ; d'autre part, la pellicule attaquée par le champignon devient un organe mort, l'évaporation de l'eau est facilitée et le jus se concentre. Le moût qu'on exprime de ces raisins pourris a une fermentescibilité très diminuée. Le fait fut observé dès 1888 par MULLER-THURGAU (90) sur les vins du Rhin ; cet auteur en trouvait l'explication dans l'appauvrissement du milieu en certaines substances nutritives, indispensables aux levures, telle que l'ammoniaque. Quelques essais conduits au laboratoire nous ont montré cependant que l'activité moindre et la croissance limitée que manifestent les levures dans ces milieux, ont des causes plus complexes.

I. — Essais de fermentation des moûts botrytisés

Dans une première expérience, nous avons fait différents coupages de moûts blancs provenant l'un d'une vendange saine, l'autre de raisins pourris noble. Ces moûts sont filtrés pour éliminer les levures du cru. Puis on prépare une série de flacons qui reçoivent des mélanges plus ou moins riches en moût pourri. Ces mélanges sont ramenés à la même concentration en sucre (12° Baumé) et, afin d'éviter l'influence d'une carence azotée, on ajoute dans chaque milieu 100 mg par litre d'azote ammoniacal sous forme de chlorure d'ammonium. On ensemence et on laisse fermenter à l'abri de l'air à 25°C. A intervalles voulus le sucre restant est dosé dans chacun des flacons et les levures totales sont comptées.

On peut constater alors que les vitesses de fermentation diminuent beaucoup quand augmente la proportion en moût pourri, tandis qu'il se forme davantage d'acidité volatile. Dans cet essai cependant, ni une trop grande richesse en sucre ni une déficience azotée ne peuvent être considérées comme la cause de ce ralentissement.

Cet essai est déjà significatif. Toutefois, on peut arguer que les divers mélanges expérimentés, provenant de deux moûts de composition très différente, ne sont pas exactement comparables. Afin de réaliser l'uniformité de composition des milieux de base, nous avons été amenés à opérer avec des cultures pures de *Botrytis cinerea* sur moût de raisin et à employer comme milieu de fermentation des moûts ainsi épuisés. La souche de *Botrytis cinerea* utilisée dans ce travail a été prélevée sur un raisin pourri de Sauternes et isolée par passages successifs sur des milieux nutritifs solides. Cette souche est cultivée sur moût de raisin riche en sucre, sans modification du pH naturel. L'activité d'autres souches de Botrytis cultivées sur divers autres milieux de culture sera étudiée dans un paragraphe suivant.

On utilise comme récipients de culture des erlenmeyers d'un litre bouchés d'un tampon d'ouate et contenant 300 cm^3 de moût seulement, afin de réaliser une bonne surface de développement et une aération

suffisante. La température la plus favorable pour la culture du Botrytis est voisine de 20°C. A température inférieure ou supérieure la croissance du Botrytis est ralentie.

Pour faciliter l'ensemencement, on utilise comme levain une suspension de spores, obtenue par agitation d'une culture de Botrytis sur moût de raisin, âgée de 8 à 10 jours. On ensemence avec quelques gouttes de ce liquide. Les spores ainsi introduites dans les flacons de culture stérilisés, germent à la surface du moût et un mycélium ne tarde pas à recouvrir toute la surface du liquide. Après 10 à 15 jours de développement, le mycélium est séparé du milieu nutritif et le moût ainsi épuisé est expérimenté.

a) **Enrichissement des moûts botrytisés en certains éléments.** — Les premiers essais effectués avec du moût ayant servi de culture au *Botrytis cinerea* ont montré, comme dans le cas des moûts naturels, que la fermentescibilité du moût était fortement diminuée. Nous nous sommes tout d'abord attachés à restituer au moût pourri les matériaux susceptibles de lui avoir été soustraits et dont on connaît l'importance sur le comportement des levures : azote et vitamines en particulier. On sait que le champignon s'attaque surtout à l'azote ammoniacal du milieu ; toutefois, pour parer à une déficience possible en azote organique, nous avons, outre l'addition d'ammoniaque, essayé l'enrichissement en asparagine, qui assure mieux que tout autre acide aminé la croissance maximum des levures dans un milieu synthétique. Nous avons, de plus, enrichi le moût pourri en vitamine B_1 et nous avons encore introduit l'activeur d'*Aspergillus niger*.

L'expérience suivante a été réalisée. Un certain volume de moût de raisin ayant 200 g de sucre et 46 mg par litre d'azote ammoniacal, est ensemencé de spores de Botrytis. Par ailleurs, on conserve à l'abri de toute contamination une certaine quantité de ce même moût.

Quand la surface du liquide dans les flacons de culture est entièrement recouverte par le mycélium en pleine sporulation, on sépare ce dernier du liquide. Le champignon a abaissé les sucres à 174 g par litre, l'ammoniaque à 18 mg. Le moût de culture est alors ramené à sa concentration initiale en sucres. A l'exception d'un petit volume que l'on fera fermenter après simple décantation, le reste du moût pourri est ramené aussi à sa teneur initiale en azote ammoniacal et réparti dans une série de flacons.

On garde un de ces flacons tel quel ; chacun des autres reçoit respectivement 0,5 mg par litre de vitamine B_1, 500 mg par litre d'activeur fongique, 100 mg par litre d'asparagine. En outre, l'un des flacons fermentera en présence d'une quantité de mycélium finement broyé correspondant à son volume et un autre sera chauffé à 120°C pendant 20 minutes.

On ensemence ces divers milieux avec *S. ellipsoïdeus* n° 51 et on laisse fermenter à 25°C dans les deux conditions habituelles d'aération. On suit la marche des fermentations.

Les mêmes résultats se retrouvent dans les deux conditions d'aération, mais le manque d'oxygène accuse plus fortement les écarts. Aussi, nous contenterons-nous d'étudier comparativement, à l'abri de l'air seulement, les fermentations du moût sain et du moût pourri différemment traités. Le tableau XVI rassemble les résultats obtenus.

TABLEAU XVI

Fermentation du moût pourri après addition des substances épuisées par le Botrytis

Sucre en g par litre. Levures en milliers par mm³.

		5 jours	7 jours	12 jours	Sucre restant après 1 mois	Acidité volatile
Moût sain	Sucre fermenté.....	116	158	194	3,4	0,48
	Nombre de levures.....	*52*	*58*	*60*		
Moût pourri décanté	Sucre fermenté.....	8	29	123	5,4	0,78
	Nombre de levures.....	*3*	*25*	*40*		
Moût pourri ramené à la teneur initiale en NH_4	Sucre fermenté.....	13	39	133	5,4	0,82
	Nombre de levures.....	*4*	*25*	*38*		
Moût pourri + 0,5 mg B_1	Sucre fermenté.....	13	50	136	5,4	5,78
	Nombre de levures.....	*4*	*25*	*35*		
Moût pourri + 0,5 g activeur	Sucre fermenté.....	24	49	140	5,4	0,60
	Nombre de levures.....	*11*	*31*	*45*		
Moût pourri + asparagine	Sucre fermenté.....	13	39	133	5,4	0,67
	Nombre de levures.....	*11*	*36*	*36*		
Moût pourri + mycélium	Sucre fermenté.....	110	159		2,5	0,74
	Nombre de levures.....	*68*	*68*			
Moût pourri chauffé à 120°C	Sucre fermenté.....	100	142	173	4,6	0,42
	Nombre de levures.....	*49*	*51*			

Douze jours après l'ensemencement, la fermentation du moût sain est terminée. Tout le sucre est pratiquement transformé, le nombre des levures atteint 60 000 par mm³. A ce moment, la fermentation n'a touché que la moitié du sucre du moût pourri et la population finale de ce milieu est inférieure de 33 p. 100 à la précédente.

La fermentation du moût pourri ramené à sa teneur initiale en azote ammoniacal, est à peine améliorée. L'asparagine n'a, non plus, aucun effet accélérant ; elle augmente le nombre de levures au début de la fermentation, qui se poursuit ensuite comme s'il n'y avait pas eu d'addition. De même, la vitamine B_1 ne modifie pratiquement pas la marche de la fer-

mentation du moût pourri. L'activeur fongique paraîtrait un peu plus efficace au premier abord. Il provoque une légère accélération, qui se traduit par une avance de 11 g de sucre au cinquième jour. Mais cette addition au moût sain accélère sa fermentation de la même manière et le même écart subsiste.

Par contre, l'action du chauffage est bien plus importante. Sans lui redonner toutefois la fermentescibilité du moût sain, le chauffage prolongé du moût pourri à 120°C accélère considérablement la vitesse de fermentation. La diminution du nombre total des levures n'est plus que de 12 p. 100. Alors que l'acidité volatile en fin de fermentation est toujours plus élevée dans les moûts pourris, l'intervention d'un chauffage la ramène au même taux que celui qui est produit dans le moût sain.

L'addition au moût pourri de mycélium de Botrytis broyé agit encore plus fortement que le chauffage. En sa présence, la fermentation du moût pourri reprend une vitesse très comparable à celle du moût sain et la population finale est même supérieure à celle de ce dernier.

En résumé, le moût pourri fermente beaucoup plus lentement que le moût avant culture. Ce n'est pas une carence en ammoniaque, en azote organique ou en vitamine B_1 qui est ici en cause. L'addition de mycélium de Botrytis broyé qui redonne à la fermentation du moût pourri toutes les caractéristiques de celle du moût sain, pourrait nous amener à invoquer cependant un phénomène de carence. Le mycélium broyé diminue la vitesse de fermentation du moût sain; ajouté au moût pourri, il l'accélère. Il semble bien, comme cela sera démontré plus loin, qu'il y ait dans le mycélium des substances activantes à côté de substances inhibitrices.

Par contre, le chauffage accélère fortement la vitesse de fermentation du moût pourri. Il ne peut agir que par destruction, et il faut donc admettre que le retard subi par la fermentation du moût pourri est due à la présence de substances détruites en grande partie à 120°C.

b) **Action des diverses sécrétions fongiques.** — Le *Botrytis cinerea*, en culture sur moût de raisin, synthétise un certain nombre de substances, dont certaines sont bien connues. Laborde a constaté que la combustion du sucre par la moisissure s'accompagne de la formation de notables quantités de glycérol (130). Le champignon sécrète en outre un grand nombre de diastases qui assurent l'assimilation des matières protéiques et glucidiques, par exemple l'oxydase et la cytase ou cellulase. Quoique parfois importantes, les quantités de glycérol contenues dans les moûts pourris ne peuvent gêner les levures. Par contre, les effets oxydants de l'oxydase et la présence de dextrane, dont la production est due à la cellulase, pourraient nuire, pour des raisons d'ailleurs très différentes, à la fermentation alcoolique des moûts pourris.

Nous avons étudié l'influence de tous ces facteurs sur la fermentation

du moût de raisin pourri en cherchant à les éliminer ou, au contraire, en les ajoutant en excès dans un milieu sain, au cours de plusieurs séries d'essais.

Influence sur la fermentation du dextrane et des spores de Botrytis. — Le dextrane, polymère du glucose d'un poids moléculaire de plusieurs millions, est produit par le Botrytis à partir de la cellulose ou des sucres du raisin. Lorsque le champignon est cultivé *in vitro*, le dextrane s'accumule sous le mycélium, formant une véritable zooglée lisse et visqueuse. Une petite quantité passe en solution dans le milieu de culture. Le dextrane est précipité intégralement dans l'alcool à 25°, agglutiné en filaments plus ou moins longs. Dans nos cultures, nous en avons recueilli une assez forte quantité qui, lavée à l'alcool a été redissoute dans un moût sain qui prend alors un aspect visqueux. D'après MOREAU, « il est possible que le dextrane retarde la fermentation des vins qui en sont très chargés » (131). En réalité, la fermentation du moût enrichi en dextrane a été plutôt légèrement activée. Dans nos conditions d'expérience, il est certain que le dextrane ne joue aucun rôle inhibiteur dans la fermentation du moût pourri.

On aurait pu penser que la présence de spores de Botrytis, très nombreuses dans le moût pourri, pouvaient inhiber les levures par un phénomène d'antagonisme. Ces spores peuvent être retenues par filtration serrée, qui du reste retient encore le dextrane. Un essai effectué dans ce sens a montré que la filtration du moût pourri favorise bien un peu le départ de la fermentation, mais au quatrième jour l'écart ne porte que sur 16 g de sucre fermenté et au septième jour le sucre fermenté et le nombre des levures sont identiques dans les deux milieux (tableau XVII). La vitesse de fermentation du moût pourri filtré reste donc toujours très inférieure à celle du même moût sain. La présence de dextrane et de spores de Botrytis ne peut donner l'explication des inhibitions constatées.

TABLEAU XVII

Elimination du dextrane et des spores de Botrytis par filtration

Sucre en g par litre. Levures en milliers par mm³

		2 jours	4 jours	7 jours
Moût sain	Sucre fermenté.....	59	128	192
	Nombre de levures	*45*	*52*	*60*
Moût pourri	Sucre fermenté.....	6	90	172
	Nombre de levures	*4*	*28*	*34*
Moût pourri filtré	Sucre fermenté.....	34	106	172
	Nombre de levures	*14*	*30*	*34*

Action des diastases fongiques. — On sait depuis LABORDE (132) que le Botrytis élabore notamment une polyphénol-oxydase, qui provoque en présence de l'oxygène de l'air, l'oxydation des polyphénols. C'est le phénomène de la casse oxydasique. D'autre part, la sécrétion par certaines moisissures de glucose-oxydase qui provoque l'oxydation du glucose en acide gluconique avec libération d'eau oxygénée dans le milieu, a été étudiée par plusieurs auteurs. Récemment, PEYNAUD et CHARPENTIÉ (133), dosant l'acide gluconique dans les vins et les moûts de raisin, ont montré que, si les moûts sains en sont pratiquement dépourvus, on peut en trouver des doses allant jusqu'à 2g par litre dans les moûts botrytisés et les vins qui en proviennent. La présence de glucose-oxydase est donc vraisemblable dans de tels moûts, mais les quantités d'eau oxygénée formées ne paraissent pas susceptibles cependant de provoquer des inhibitions aussi fortes que celles que nous avons pu observer. D'ailleurs, les oxydases sont très sensibles à la chaleur et sont détruites à des températures voisines de 80°C. Or, en portant un moût pourri à 100° avant l'ensemencement et en le refroidissant rapidement, ce qui le met à l'abri de l'activité des diastases oxydantes, on ne redonne pas au moût pourri une fermentescibilité meilleure, quoiqu'on augmente légèrement la croissance levurienne au cours de la fermentation.

En résumé, l'inhibition provoquée par le *Botrytis cinerea* dans la fermentation du moût pourri, n'est imputable ni au dextrane, ni à la présence de spores dans le moût. Elle ne peut être due que pour une très faible part à l'activité des oxydases sécrétées par le Botrytis. Il faut donc admettre que dans le moût botrytisé, et déjà appauvri en éléments nécessaires à la croissance des levures, à la très faible action qu'exercent certains produits déjà connus du métabolisme fongique, s'ajoute l'action beaucoup plus considérable de substances inhibitrices encore inconnues, véritables antibiotiques des levures.

c) **Action de l'anhydride sulfureux.** — Tout d'abord, pour tenter de rapprocher ces substances inhibitrices d'autres antibiotiques connus, nous avons essayé l'influence sur la fermentation du moût pourri de produits que l'on sait pouvoir détruire l'activité de certains antibiotiques. La cystéine par exemple, d'après WAKSMAN, possède cette propriété vis-à-vis de la streptomycine. La cystéine retarde légèrement la fermentation et diminue la population du moût sain, mais elle n'a pratiquement aucun effet sur la fermentation du moût pourri.

Par contre, l'action de l'anhydride sulfureux à faible dose sur le moût pourri est remarquable. Au cours de plusieurs essais, on a pu constater que 50 mg par litre d'anhydride sulfureux ajoutés au moût sain ne modifient pratiquement pas sa fermentation, alors que les mêmes quantités ajoutées au moût pourri accélèrent la marche de sa fermentation à tel

point qu'elle se rapproche de celle du moût sain ; en outre, la population des levures est fortement augmentée. Le tableau XVIII en donne un exemple. Alors que le nombre des levures est diminué de 43 p. 100 dans le moût pourri, cette diminution n'est plus que de 22 p. 100 lorsqu'on ajoute 50 mg d'anhydride sulfureux par litre.

TABLEAU XVIII

Action de l'anhydride sulfureux sur la fermentation du moût pourri

Sucre en g par litre. Levures en milliers par mm^3.

		2 jours	4 jours	7 jonrs	Sucre restant après 1 mois
Moût sain.....	Sucre fermenté.....	59	128	192	2,6
	Nombre de levures	*45*	*52*	*60*	
Moût pourri.....	Sucre fermenté.....	6	90	172	6,2
	Nombre de levures	*4*	*28*	*34*	
Moût sain + 50 mg SO_2..	Sucre fermenté.....	56	123	196	3,4
	Nombre de levures	*46*	*53*	*60*	
Moût pourri + 50 mg SO_2	Sucre fermenté.....	40	123	183	4,4
	Nombre de levures	*31*	*48*	*47*	

Le fait a d'ailleurs pu être observé dans la pratique de la vinification en Sauternais. L'addition d'une faible dose d'anhydride sulfureux dans une barrique de moût botrytisé, avant le départ de la fermentation, favorise toujours la fermentation (58). L'anhydride sulfureux détruit l'antibiotique, soit en le réduisant, soit en se combinant avec lui.

Nous avons donc mis en évidence la présence, dans le moût de raisins botrytisés, de substances antibiotiques antilevures détruites en grande partie par l'anhydride sulfureux et ne résistant pas à un chauffage prolongé à 120°C. Nous désignerons dorénavant ces substances sous le nom de « *botryticine* ».

Précisons tout de suite que cet antibiotique a peu de chances de trouver une utilisation dans la pratique de la conservation des vins sucrés, puisque le sulfitage le détruit. Quoiqu'il en soit, son étude est fort intéressante, car il est présent naturellement dans les moûts de raisins pourris ; il joue en vinification un rôle certain qu'il faut connaître.

II. — Essais de séparation et de purification de la botryticine

Nous avons tenté d'extraire la botryticine du moût pourri, tout d'abord au moyen de solvants, puis par floculation par l'alcool éthylique, enfin par adsorption sur le charbon activé en poudre.

Pour doser l'activité des préparations antibiotiques ainsi obtenues, nous opérons de la manière suivante : la préparation à étudier est ajoutée à un certain volume de moût de raisin qu'on ensemence ensuite avec quelques gouttes d'un levain frais du *Saccharomyces cerevisiae* n° 51 de notre collection. On suit la marche de la fermentation comparativement à celle du même moût sain fermentant dans les mêmes conditions expérimentales, mais sans addition de préparation inhibitrice, et qui constitue le témoin. De l'inhibition subie par la levure utilisée, constatée par comparaison des fermentations du moût témoin et du moût pourri, on estime qualitativement l'activité de cette préparation.

a) **Extraction par solvants.** — Nous citons pour mémoire les extractions du moût pourri par les solvants classiques : éther sulfurique, éther de pétrole, etc..., qui ont été essayées sans succès. Le moût pourri était longuement agité à trois reprises avec son volume de solvant ou traité dans un appareil d'extraction continue. Le résidu de la distillation du solvant n'a montré aucun effet inhibiteur. De même, le floculat obtenu par précipitation avec 70 p. 100 en volume d'acétone n'en a pas davantage.

Par contre, un essai concluant a montré que l'alcool éthylique permet une bonne insolubilisation de l'antibiotique.

b) **Précipitation par l'alcool éthylique.** — Lorsqu'on porte un moût pourri à 70 ou 80° d'alcool, il se forme un lourd précipité brun qui, après quatre à cinq jours de repos, est recueilli par centrifugation, lavé à l'alcool neutre et égoutté. Ajouté à un volume de moût sain, égal au volume du moût pourri traité, l'inhibition provoquée par ce floculat est aussi forte que celle qu'on observe lorsque le moût a servi de milieu de culture au Botrytis (fig. 12 et 13). Il est, de plus, possible de le dissoudre dans un volume plus faible de moût et de renforcer ainsi l'action de la botryticine.

On peut de même extraire la botryticine du mycélium du Botrytis finement broyé. A cet effet, celui-ci est lavé à plusieurs reprises à l'eau tiède bouillie. Débarrassé du dextrane par un premier traitement à 25° d'alcool, l'extrait aqueux porté à 80° d'alcool donne un floculat blanc, abondant, dont l'effet inhibiteur sur les levures est très marqué. Les substances antibiotiques sécrétées par le Botrytis se trouvent donc également dans le mycélium et elles diffusent dans le moût de culture.

Nous traiterons successivement : 1° de la solubilité des préparations alcooliques dans le moût sain ; 2° du degré alcoolique indispensable à la floculation complète de la botryticine ; 3° d'un essai de purification par précipitations successives par l'alcool ; 4° de la conservation de ces floculats alcooliques.

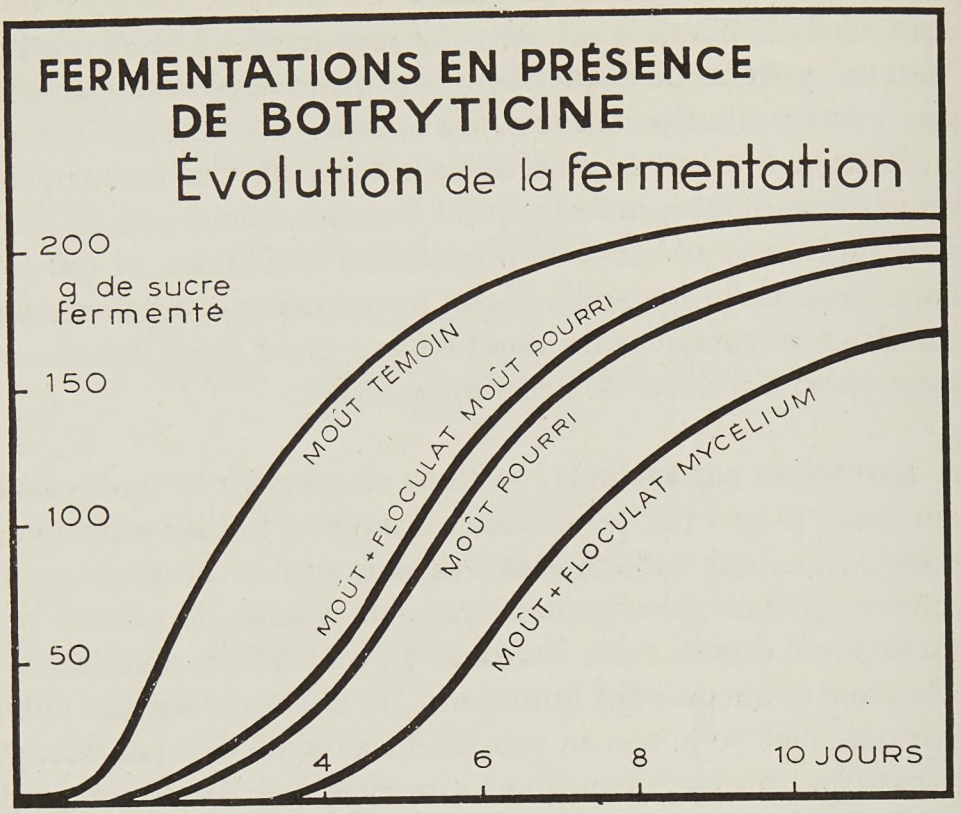

FERMENTATIONS EN PRÉSENCE
DE BOTRYTICINE
Évolution de la fermentation
200
g de sucre
fermenté
150
100
50
MOÛT TÉMOIN
MOÛT + FLOCULAT MOÛT POURRI
MOÛT POURRI
MOÛT + FLOCULAT MYCÉLIUM
4
6
8
10 JOURS

FIG. 12

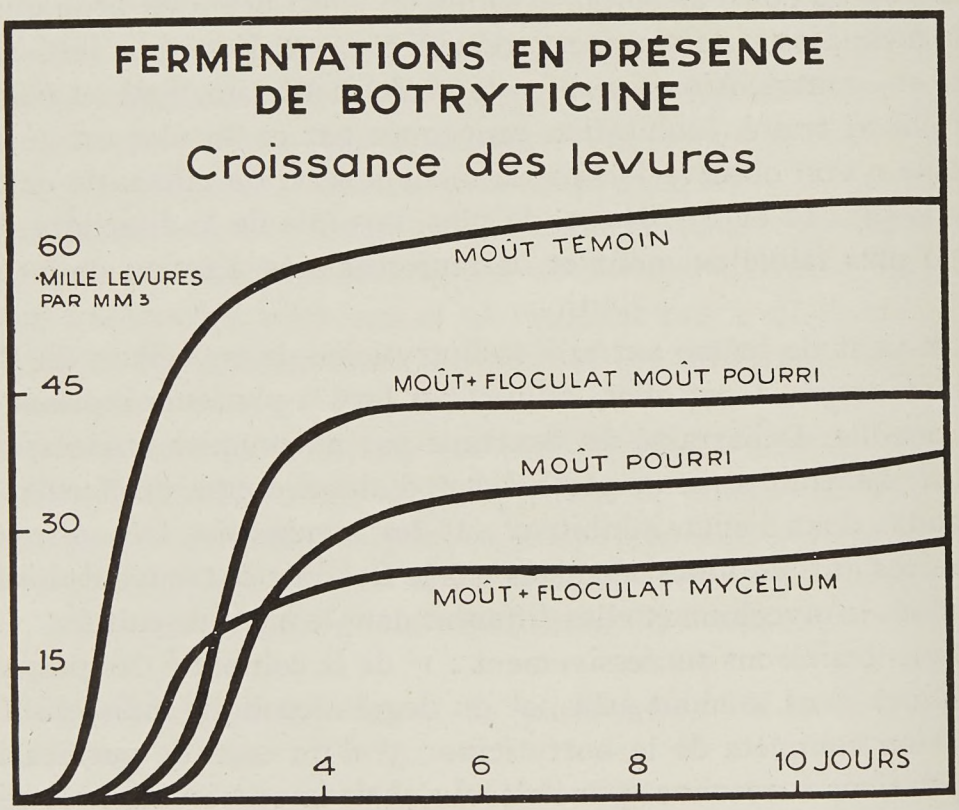

FERMENTATIONS EN PRÉSENCE
DE BOTRYTICINE
Croissance des levures
60
MILLE LEVURES
PAR MM 3
45
30
15
MOÛT TÉMOIN
MOÛT+ FLOCULAT MOÛT POURRI
MOÛT POURRI
MOÛT + FLOCULAT MYCÉLIUM
4
6
8
10 JOURS

FIG. 13

c) **Solubilité de la botryticine dans le moût.** — Le floculat obtenu en portant le moût pourri à 80° d'alcool est, outre la substance antibiotique qu'il contient, surchargé de matières d'origine non fongique : gommes, mucilages, pectines, arabanes, protéines, etc... Ces substances existent du reste également dans tous les moûts obtenus avec des raisins parfaitement sains.

Séparées du moût sain par précipitation alcoolique et ajoutées à un autre moût sain, ces matières en freinent déjà assez fortement la fermentation. Il en est de même lorsqu'on traite du moût de bière non houblonné.

Cette observation précise une notion particulièrement importante au point de vue pratique. Le raisin sain, mûr, contient à côté de substances qui favorisent le développement des levures et activent la fermentation alcoolique, acides aminés et vitamines fonctionnant comme facteurs de croissance et autres facteurs encore inconnus, des substances qui, au contraire, gênent et peuvent empêcher le développement des levures et retardent la fermentation. Les fermentescibilités très diverses des moûts de raisin observées dans la pratique trouvent dans ces notions leur explication profonde. Nous retrouvons ici une opinion que développait BASTIN dans un mémoire récent (134) : « En règle générale, la cellule vivante renferme côte à côte des accélérateurs et des inhibiteurs aux concentrations sans cesse variables ».

Ces floculats alcooliques ne se dissolvent jamais complètement dans le moût. Il se forme un dépôt brunâtre au fond des flacons. Lorsqu'après 24 heures de contact avec le moût on sépare ce dépôt, on constate que toute la substance inhibitrice a été dissoute dans le liquide ; le dépôt insoluble reste inactif. Il en est de même du floculat obtenu à partir des eaux de lavage du mycélium de Botrytis.

d) **Degré alcoolique optimum de floculation de la botryticine.** — Pour préciser les meilleures conditions de précipitation, nous avons réalisé l'essai suivant. Le moût pourri et les eaux de lavage du mycélium sont traités séparément et de la même manière. Quatre parts égales sont faites de chaque volume. Après élimination du dextrane dans l'alcool à 30°, nous portons chacune d'elles respectivement à 50, 60, 70, 80° d'alcool. Il se produit un abondant précipité, dont le poids sec est évalué sur une fraction. Rapportés au litre, ces poids sont donnés dans le tableau XIX.

Ces divers floculats, égouttés, sont ajoutés à un volume de moût sain titrant 230 g de sucre par litre. Le tableau XIX donne les résultats de ces essais. L'action du floculat de moût pourri obtenu à 50° d'alcool se manifeste par un retard du départ de la fermentation du milieu dans lequel il a été ajouté ; mais très vite la marche de la fermentation se rapproche de celle du moût témoin. Le nombre de levures final n'est diminué que de 20 p. 100.

TABLEAU XIX

Activité des floculats de moûts pourris en fonction du degré alcoolique de précipitation

Moût de 230 g de sucre par litre. Fermentation à l'abri de l'air.

	Poids sec du précipité g		7 jours	11 jours	22 jours	30 jours sucre restant
Témoin sain.....		Sucre fermenté.....	147	179	189	38
		Nombre de levures.....	*42*	*56*	*49*	
+ Floculat obtenu à 50° d'alcool.....	3,98	Sucre fermenté.....	144	172	177	50
		Nombre de levures.....	*35*	*39*	*39*	
+ Floculat obtenu à 60° d'alcool.....	4,08	Sucre fermenté.....	10	123	172	55
		Nombre de levures.....	*5*	*27*	*33*	
+ Floculat obtenu à 70° d'alcool.....	7,04		Pas de fermentation			230
+ Floculat obtenu à 80° d'alcool.....	7,60		Pas de fermentation			230

Le floculat obtenu à 60° provoque un retard plus accentué. En sa présence la fermentation ne se déclare que 7 jours après l'ensemencement, alors que les trois-quarts du sucre initials ont déjà transformés dans le témoin. Le nombre total des levures en fin de fermentation est inférieur de 32 p. 100 à celui du témoin. Les floculats de moût pourri à 70 et 80° d'alcool ont rendu toute fermentation impossible : les levures ont été complètement inhibées.

Les mêmes observations ont pu être faites quant à l'efficacité des floculats des eaux de lavage du mycélium, obtenus à différentes concentrations en alcool. L'importance de l'inhibition provoquée par les floculats alcooliques croît donc avec le degré alcoolique auquel ils ont été floculés. L'écart est surtout très marqué entre 60 et 70°. 70° constituent le seuil minimum d'une floculation satisfaisante de la botryticine, mais 80° d'alcool permettent d'obtenir la précipitation complète.

Cependant, les floculats ainsi obtenus renferment surtout des matières colloïdales indifférentes ou inhibitrices qu'on trouve dans tous les moûts de raisin, car il n'est pas possible de précipiter totalement la véritable substance antibiotique sans les entraîner. La séparation de ces matériaux inhibiteurs ou non, constitue tout le problème de la purification de la botryticine. A cet effet nous avons utilisé des précipitations successives des colloïdes moins solubles que la botryticine.

e) **Précipitations successives par l'alcool des substances inhibitrices.** — Avec un moût sur lequel on a laissé se développer durant 15 jours une culture de *Botrytis*, nous avons réalisé l'essai suivant :

On fait trois parts égales du volume total. La première est précipitée par l'alcool à 80°. La seconde subit deux précipitations : le premier floculat à 80° d'alcool est dissous dans l'eau, et la solution aqueuse est à nouveau floculée immédiatement à 80°. Enfin, la troisième subit trois précipitations consécutives dans les mêmes conditions.

La couleur du premier floculat est brun foncé ; au fur et à mesure des précipitations, la couleur des floculats s'éclaircit. Le troisième floculat, dont le poids n'est plus que les deux-tiers du floculat initial, est blanchâtre.

Chacun des différents floculats provient d'un volume de moût pourri 5 fois supérieur au volume du moût sain dans lequel il est ajouté. On ensemence ces moûts après addition des floculats et on laisse fermenter à l'abri de l'air à 25°C. On suit les fermentations comparativement à celle du même moût gardé sain.

TABLEAU XX

Précipitations successives par l'alcool de la botryticine

Moût de 205 g par litre. Fermentation à l'abri de l'air.

		6 jours	8 jours	14 jours	30 jours sucre restant
Témoin sain.....	Sucre fermenté.....	174	203	200	4
	Nombre de levures.....	51	53	55	
+ 1er floculat.....	Sucre fermenté.....		0	92	77
	Nombre de levures.....		10	30	
+ 2e floculat.....	Sucre fermenté.....		0	126	70
	Nombre de levures.....		5	35	
+ 3e floculat.....	Sucre fermenté.....		3	125	64
	Nombre de levures.....		2	30	
+ 3e floculat (48 h d'attente)	Sucre fermenté.....	52	138	205	6
	Nombre de levures.....	28	35	44	

De l'examen du tableau XX qui expose les résultats obtenus, on constate que les retards provoqués sont toujours considérables et restent du même ordre de grandeur après une, deux ou trois précipitations successives (à la condition cependant que ces précipitations soient effectuées immédiatement après la dissolution dans l'eau des floculats). Au bout du huitième jour par exemple, la fermentation est pratiquement terminée dans le témoin sain, elle ne fait que débuter en présence des floculats obtenus en une, deux, trois précipitations consécutives ; elle laissera, après plus d'un mois, des quantités importantes de sucre dans le liquide.

Par contre, lorsque les précipitations successives sont effectuées en

laissant un repos de 24 heures entre chacune d'elles, la fermentation est beaucoup moins retardée. Il y a certainement une destruction spontanée de l'antibiotique au cours de ce repos. Le fait est encore plus net lorsque le floculat reste plus de 48 heures en solution.

Les floculats obtenus à partir des moûts pourris chauffés à 100°C avant toute précipitation, nous permettent de faire une observation intéressante : l'inhibition provoquée par le floculat est du même ordre de grandeur, quel que soit le temps de repos en solution aqueuse.

Ces observations indiquent que le pouvoir antibiotique de la préparation aqueuse se détruit rapidement à la température ordinaire sous l'action des oxydases ou autres diastases du milieu, tandis qu'il est conservé par un chauffage de la préparation à 100°C. Il y a donc intérêt avant toute autre manipulation, à porter rapidement le moût pourri et l'extrait aqueux du mycélium à cette température pour les stabiliser.

f) **Conservation des préparations alcooliques de botryticine.** — Nous précisons tout d'abord l'influence du chauffage sur la stabilisation des solutions aqueuses de botryticine. Le floculat alcoolique provenant de 800 cm³ de moût pourri est dissous dans 400 cm³ d'eau bouillie froide. On élimine par centrifugation le résidu insoluble et on fait deux parts égales de la solution : l'une est gardée telle quelle, la deuxième est chauffée un quart d'heure à 100°C au bain-marie. Les deux liqueurs sont ensuite conservées à l'air, à température ambiante, pendant trois jours. Après ce temps, on traite chacune d'elles à 80° d'alcool et on les ajoute à 150 cm³ de moût de raisin titrant 250 g de sucre par litre. On fait fermenter la levure n° 51 dans chacun de ces milieux et parallèlement dans le même moût gardé sain, à 25°C, à l'abri de l'air.

L'inhibition provoquée par chacun des floculats est importante : le retard de la fermentation par rapport à celle du témoin est de l'ordre d'une centaine de grammes de sucre au début de la fermentation. Cependant, la solution conservée pendant trois jours sans chauffage préalable a perdu un cinquième environ de son pouvoir antibiotique. Les solutions de floculat provenant des moûts botrytisés conservent donc beaucoup mieux leur activité antilevure lorsqu'on les stabilise par un chauffage à 100°C.

Nous avons conduit plusieurs séries d'essais pour fixer les conditions de conservation de la botryticine au cours d'une longue durée. Le floculat alcoolique de 3,5 l de moût pourri est dissous dans la moitié de son volume d'eau bouillie froide. La liqueur est rapidement portée à 100°C et après refroidissement, on élimine par centrifugation la partie insoluble. La solution est alors partagée en 7 volumes égaux qui sont conservés pendant un mois dans les conditions suivantes :

1° Sous forme de solution, en flacon bouché plein, à la température ordinaire.

2° Sous forme de solution, en flacon rempli aux deux tiers et bouché par un tampon d'ouate.

3° Sous forme de solution, en flacon bouché plein, à la glacière à 0° environ.

4° Sous forme de floculat conservé dans l'alcool de floculation à la température ambiante.

5° Sous forme de floculat conservé dans l'alcool de floculation à la température de 0°.

6° Sous forme de floculat à l'état sec (après centrifugation et séchage spontané), à la température ambiante.

7° Sous forme de floculat à l'état sec, à la température de 0°.

Après un mois, les solutions 1, 2, 3, sont floculées à 80° d'alcool et les différents floculats sont ajoutés à 150 cm³ de moût sain qui reçoivent ainsi une quantité de substance antibiotique provenant de trois fois leur volume de moût pourri. Les fermentations s'opèrent à 25°C, à l'abri de l'air ; le moût sain titre 238 g de sucre par litre. Le tableau XXI reproduit la marche des fermentations.

Tableau XXI

Conservation de la botryticine dans différentes conditions

Fermentation d'un moût de raisin, de 238 g de sucre, à l'abri de l'air.

		5 jours	7 jours	10 jours	21 jours	1 mois après sucre restant
Témoin	Sucre fermenté.....	160	176	188	200	38
	Nombre de levures.....	*40*	*46*	*48*	*48*	
(1) En solution à l'abri de l'air	Sucre fermenté.....	107	125	149	171	62
	Nombre de levures.....	*16*	*27*	*30*	*35*	
(2) En solution à l'air	Sucre fermenté.....	107	113	146	171	59
	Nombre de levures.....	*17*	*27*	*31*	*35*	
(3) En solution à l'abri de l'air à 0°C	Sucre fermenté	82	100	142	171	62
	Nombre de levures.....	*16*	*25*	*29*	*30*	
(4) Dans l'alcool	Sucre fermenté		21	66	113	125
	Nombre de levures.....		*7*	*11*	*21*	
(5) Dans l'alcool à 0°C	Sucre fermenté		11	30	72	133
	Nombre de levures.....		*2*	*4*	*12*	
(6) Etat sec	Sucre fermenté	160	176	188	200	38
	Nombre de levures.....	*33*	*35*	*42*	*46*	
(7) Etat sec à 0°C	Sucre fermenté	46	72	83	113	125
	Nombre de levures.....	*9*	*12*	*20*	*24*	

Après un mois de conservation, l'inhibition la plus forte est donnée par le floculat gardé en glacière dans son alcool de floculation (préparation 5) : au septième jour par exemple, le retard sur la fermentation témoin est de 165 g de sucre. Le floculat conservé de la même manière, mais à la température ambiante, montre un effet inhibiteur à peine atténué. Les diverses solutions aqueuses freinent encore la fermentation, mais on peut estimer, comparativement à l'inhibition provoquée par les préparations 4 et 5, qu'elles ont perdu les deux tiers environ de leur pouvoir inhibiteur original.

Conservée sous forme de floculat sec en glacière, la préparation 7 est bien moins active que la préparation 4, mais son efficacité est cependant assez marquée. Au septième jour par exemple, le retard provoqué, par rapport à la fermentation témoin, est de 104 g de sucre ; en fin de fermentation, le nombre total des levures est diminué de 50 p. 100. Mais la préparation de floculat sec à la température ambiante, ne possède plus trace de pouvoir inhibiteur. Le flacon contenant ce floculat fermente exactement comme le témoin. Sans aucune manipulation, sans variation sensible de poids, par simple repos à l'air, cette préparation est donc devenue complètement inactive. Ces faits sont extrêmement importants pour la poursuite de nos essais. On peut en effet, en tirer les conclusions suivantes :

1° C'est sous forme de floculat dans l'alcool de floculation, à basse température, que la substance inhibitrice extraite du moût pourri se conserve le mieux.

2° Deux précipitations successives dans l'alcool donnent une préparation de la substance antilevure déjà un peu mieux purifiée.

3° Enfin, le fait qu'au bout d'un mois, la substance antibiotique est totalement détruite dans certaines conditions et pas dans d'autres, est une preuve formelle supplémentaire de la réalité de la botryticine.

g) **Action de divers facteurs sur les fermentations en présence de botryticine.** — Nous avions déjà étudié l'action de l'anhydride sulfureux sur la fermentation du moût botrytisé. Pour nous assurer de l'identité de la substance ainsi détruite dans le moût pourri et de celle qui est extraite par floculation de ce même moût, nous avons réalisé l'expérience suivante : On fait une solution aqueuse du floculat obtenu par double traitement à 80° d'alcool, à partir de 3 litres de moût pourri. Portée rapidement à 100°C et refroidie, on l'introduit dans un moût de raisin ayant 220 g de sucre par litre de telle façon que la concentration en botryticine soit 4 fois plus forte que dans le moût pourri initial. Un volume sert de témoin ; un autre volume reçoit 50 mg d'anhydride sulfureux par litre, enfin une troisième fraction est traitée par la quantité de charbon activé suffisante pour le décolorer. On fait fermenter à 25°C, à l'abri de l'air. La figure 14 représente les courbes de fermentation.

Dans ces conditions, l'action de ce floculat est assez marquée : 95 g de sucre sont déjà fermentés dans le moût sain lorsque la fermentation commence à peine à se manifester. Le nombre total de levures est diminué de 20 p. 100.

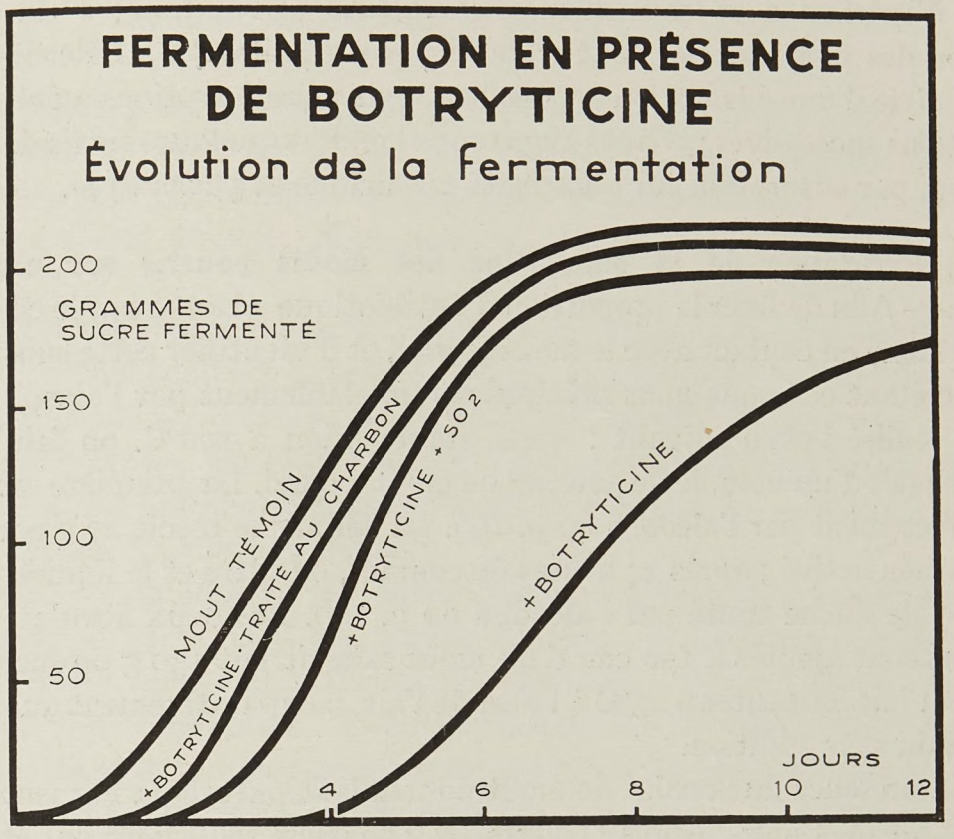


FIG. 14.

50 mg d'anhydride sulfureux par litre détruisent une grande partie du pouvoir inhibiteur ; la fermentation est accélérée et se rapproche de celle du témoin, et le nombre final de levures est le même que dans le témoin. D'autre part, le traitement au charbon enlève la presque totalité du pouvoir inhibiteur ; la botryticine est donc adsorbable par le charbon activé en poudre.

Un essai identique, réalisé avec le floculat des extraits aqueux de mycélium, a donné les mêmes résultats.

Il nous a donc été possible de refaire sur la fermentation d'un moût de raisin qui a été additionné de floculat de moût pourri, exactement les mêmes observations que celles qui furent déjà faites sur la fermentation des moûts ayant servi de culture au Botrytis. La substance extraite par floculation à l'alcool est donc bien celle qui inhibe la fermentation des moûts pourris.

III. — Extraction de la botryticine par le charbon activé

Nous avons vu dans l'expérience précédente que le charbon activé retient d'une manière satisfaisante la substance inhibitrice contenue

dans le moût pourri. En conséquence, nous avons essayé de baser sur cette propriété une méthode d'extraction et de purification de la botryticine.

Nous avons étudié : 1° l'extraction par traitement direct du moût pourri au moyen du charbon activé et élution, en précisant le pH optimum d'extraction et les meilleures conditions de l'élution ; 2° la purification des préparations, tout d'abord par précipitation à l'alcool éthylique suivie d'une adsorption au charbon, puis par adsorptions au charbon et élutions successives ; 3° nous avons enfin conduit quelques essais de purification, par adsorption sur phosphate tricalcique et par dialyse.

a) **Adsorption de la botryticine des moûts pourris sur charbon activé.** — Afin de fixer la proportion d'antibiotique adsorbé par le charbon activé laissé en contact avec le moût pourri, et d'identifier cette substance comme étant celle que nous précipitions préalablement par l'alcool, nous avons réalisé l'essai suivant : après stabilisation à 100°C, on fait deux parts égales d'un volume de 500 cm³ de moût pourri. La première est traitée directement par l'alcool à 80 p. 100. La deuxième reçoit 20 g par litre de charbon activé ; après 24 heures de contact, on filtre et le liquide décoloré est de même traité par l'alcool à 80 p. 100. Les deux floculats ainsi obtenus sont ajoutés à 150 cm³ d'un moût sain titrant 150 g de sucre par litre. On fait fermenter à 25°C à l'abri de l'air, comparativement au même moût sain sans addition.

En présence du floculat de moût pourri, le départ de la fermentation est retardé de 5 jours. Après 11 jours, 67 g de sucre seulement ont été fermentés, alors que la fermentation du témoin est terminée. La fermentation reste donc très incomplète ; elle laisse 41 g de sucre résiduel dans le milieu (tableau XXII).

TABLEAU XXII

Adsorption de la botryticine par le charbon activé

Moût de raisin de 150 g de sucre par litre. Fermentation anaérobie.

		3 jours	5 jours	11 jours	1 mois sucre restant
Moût témoin.....	Sucre fermenté	70	109	143	3,5
	Nombre de levures	*31*	*36*	*44*	
Moût + floculat de moût pourri	Sucre fermenté		12	67	41
	Nombre de levures		*16*	*31*	
Moût + floculat de moût pourri traité au charbon.	Sucre fermenté	25	67	125	8
	Nombre de levures	*22*	*27*	*41*	

Par contre l'addition du floculat du moût pourri débarrassé de l'antibiotique par le charbon activé, ne ralentit plus que très légèrement la

fermentation. L'écart avec la fermentation témoin porte sur 45 g de sucre au troisième jour, mais il n'est plus que de 18 g au onzième jour et la fermentation transforme tout le sucre.

Le charbon activé retient donc, sinon la totalité, du moins la plus grande partie de la substance inhibitrice.

b) **Élution du charbon activé.** — Nous avons essayé pour extraire la botryticine fixée sur le charbon activé, diverses liqueurs d'élution plus ou moins tamponnées et préparées à différents pH, au cours de plusieurs séries d'essais, dont nous ne donnons ici que les plus concluants.

Le moût pourri est agité et laissé au contact de 30 g par litre de charbon activé pendant 30 heures environ, en remettant souvent le liquide en suspension. Le charbon est recueilli par centrifugation et on en fait trois parts égales. On élue chacune d'elles respectivement au moyen de trois solutions différentes ajustées à pH 9 : solution phosphatée, solution ammoniacale et solution sodique.

Nous avons observé par ailleurs que le charbon activé fixe toujours une certaine proportion des sucres du moût et qu'il les abandonne à l'éluat. Une simple concentration des éluats qui peut être pratiquée sous vide, ne peut convenir à l'expérimentation, car les sucres ainsi concentrés modifient la richesse du moût d'expérience. On a donc intérêt à insolubiliser la botryticine des éluats par l'alcool éthylique, qui laisse les sucres solubles. Dans tous nos essais, l'éluat est recueilli par centrifugation et il est floculé par l'alcool à 80 p. 100.

Le floculat de l'éluat phosphaté est le plus abondant ; celui de l'éluat sodique occupe un volume insignifiant. On ajoute ces divers floculats à un même moût sain et on fait fermenter parallèlement au même moût sans addition, qui sert de témoin.

L'inhibition provoquée par le floculat alcoolique de l'éluat phosphaté est de loin la plus considérable. Au sixième jour, par exemple, le retard de la fermentation est de 83 g de sucre. Le nombre des levures en fin de fermentation est diminué de 50 p. 100. Le floculat alcoolique de l'éluat ammoniacal provoque seulement un léger retard, tandis que le floculat de l'éluat sodique n'a pratiquement aucun effet.

Etant donc établi que l'élution doit se faire en milieu phosphaté tamponné, nous avons recherché le pH optimum d'élution. Les résultats exposés dans le tableau XXIII montrent que les floculats alcooliques des différents éluats provoquent des inhibitions variables, mais toujours très nettes. Le tampon phosphaté de pH 9 est le plus efficace : au sixième jour par exemple, la fermentation est retardée en sa présence de 74 g de sucre par rapport au témoin, tandis que l'écart porte sur 20 g seulement pour les floculats des éluats à pH 8 et 8,5. Nous utiliserons donc

une solution phosphatée, ajustée à pH 9,0 au pH-mètre après mélange avec le charbon activé.

TABLEAU XXIII

Elution du charbon activé à différents pH

Moût de raisin 180 g de sucre par litre. Fermentation à l'abri de l'air

		6 jours	10 jours	1 mois sucre restant
Moût témoin	Sucre fermenté *Nombre de levures*	118 *42*	169 *46*	6,2
Botryticine éluée à pH 8,0	Sucre fermenté *Nombre de levures*	97 *23*	155 *36*	8,3
Botryticine éluée à pH 8,5	Sucre fermenté *Nombre de levures*	96 *22*	155 *30*	16,0
Botryticine éluée à pH 9,0	Sucre fermenté *Nombre de levures*	44 *16*	139 *23*	22,4

Par ailleurs, nous avons essayé la précipitation par le sulfate d'ammonium en solution concentrée, suivie d'une dialyse, technique qu'on applique habituellement à la séparation des oxydases (135). Dans ces essais, l'éluat recevait un poids de sulfate d'ammonium correspondant à 0,6 saturation en ce sel à 15°C. Après trois jours de repos en glacière, on centrifugeait. Le dépôt ainsi recueilli, de très faible volume, était redissous dans un petit volume d'eau, et on dialysait contre eau distillée à travers une poche de cellophane pour éliminer les sels d'ammonium. Dans nos divers essais, ce liquide ne présentait plus aucune action inhibitrice. La botryticine ne dialysant pas, comme on le verra plus loin, on peut en conclure que le sulfate d'ammonium ne permet pas de précipiter correctement cet antibiotique.

c) **pH optimum d'extraction de la botryticine par le charbon activé.** — Les meilleures conditions d'élution étant connues, nous avons précisé, toutes autres choses égales, l'influence du pH du moût pourri sur l'adsorption de la botryticine par le charbon activé.

Un volume de 1,2 l de moût pourri est partagé, après chauffage, en 6 volumes égaux qui sont portés respectivement aux valeurs suivantes de pH : 1,5-2,5-3,5-4,5-6 et 7. Chacun d'eux est ensuite traité de la même manière : addition de charbon activé, élution, et floculation des éluats dans 80 p. 100 d'alcool. Entre pH 3 et 4,5 le trouble est instantané et la floculation est très rapide ; elle est plus lente aux autres pH.

Ces floculats provenant de 200 cm³ de moût pourri sont ajoutés à

20 cm³ de moût sain. On fait fermenter et on suit la marche de la fermentation. Comme le montre le tableau XXIV, les floculats correspondant à des extractions à pH élevés, supérieurs à pH 5,0, activent plutôt la fermentation à son début. Ceux correspondant à des extractions à pH inférieurs à 3,0, provoquent de légers retards, mais qui ne sont plus apparents au septième jour. Par contre, les floculats à pH 3,5 et 4,5 ont empêché toute fermentation.

TABLEAU XXIV

Adsorption de la botryticine par le charbon activé en fonction du pH

Moût de raisin 215 g de sucre par litre. Fermentation à l'abri de l'air.

	Sucre fermenté après		
	5 jours	9 jours	30 jours
Témoin	39	108	214
Moût + botryticine adsorbée à pH 1,5	42	105	175
Moût + botryticine adsorbée à pH 2,5	38	99	156
Moût + botryticine adsorbée à pH 3,5	Pas de fermentation		
Moût + botryticine adsorbée à pH 4,5	Pas de fermentation		
Moût + botryticine adsorbée à pH 6,0	52	116	190
Moût + botryticine adsorbée à pH 7,0	52	103	196

C'est donc entre pH 3,0 et 4,5 que la botryticine est extraite le plus complètement du moût pourri par le charbon activé. L'acidité normale du moût pourri est du reste, le plus souvent, comprise entre ces valeurs de pH et dans nos essais précédents, nous pensons être restés dans le champ des pH optima d'extraction.

d) **Purification des préparations de botryticine.** — Les floculats alcooliques des éluats du charbon d'extraction se présentent sous forme d'un précipité blanc colloïdal, contenant des oxydases, car ils provoquent le brunissement des moûts de raisins sains. Le moût sain traité de la même manière au charbon activé donne un floculat d'aspect identique, moins abondant, dénué d'oxydases, et comme l'ont montré divers essais, pratiquement dépourvu d'effet inhibiteur sur les levures.

Dans un de ces essais, par exemple, on a traité séparément, de la manière déjà indiquée, un volume égal du moût pourri et du même moût gardé sain. Les floculats obtenus sont ajoutés à des flacons contenant 100 cm³ de milieu nutritif minéral, additionné des facteurs de croissance nécessaires et titrant 100 g de sucre par litre. On fait fermenter, comparativement au même milieu n'ayant pas reçu de floculat et constituant le témoin.

La fermentation en présence du floculat provenant de l'extraction du moût sain, marque un très léger retard sur la fermentation témoin, d'environ une vingtaine de grammes de sucre. Par contre, le floculat

provenant de l'extraction du moût pourri retarde d'une dizaine de jours le départ de la fermentation. Au quatorzième jour, la fermentation étant pratiquement terminée dans les deux autres cas, 21 g de sucre ont seulement été fermentés ici.

Cet essai nous permet de distinguer la légère inhibition due à certains constituants adsorbables et floculables du moût sain, de l'inhibition due à la botryticine qui est beaucoup plus considérable.

Pour obtenir la purification des préparations de botryticine, nous avons essayé d'utiliser le double traitement à l'alcool et au charbon activé, ou encore une série d'extractions au charbon et d'élutions successives.

e) **Précipitation par l'alcool suivie d'une adsorption sur charbon activé.** — Un litre et demi de moût pourri est amené à 80° d'alcool. Le précipité est dissous dans 750 cm³ d'eau distillée. On stabilise par chauffage 5 minutes à 100°C. Après refroidissement, on centrifuge. Le liquide recueilli reçoit alors 30 g par litre de charbon activé. Après 24 heures de contact, on élue avec un tampon phosphaté à pH 9. L'éluat est ensuite floculé à 80° d'alcool.

Ajouté à 150 cm³ de moût sain titrant 156 g de sucre par litre, le floculat provoque une très nette inhibition de la fermentation. Le retard porte sur une cinquantaine de grammes de sucre pendant la première partie de la fermentation ; le nombre final des levures est diminué de 50 p. 100. Cette inhibition n'est pas aussi importante que celles que nous avions observées avec le floculat alcoolique provenant directement du moût pourri ou encore avec floculat de l'éluat de charbon activé. Le moût sain a reçu cependant le floculat correspondant à un volume de moût pourri dix fois supérieur au sien. Les deux séparations conjuguées à l'alcool et au charbon activé permettent une première purification de la préparation de botryticine, mais au cours des manipulations nécessitées par ces opérations, une forte partie du pouvoir inhibiteur original est perdue.

f) **Adsorptions sur charbon activé et élutions successives.** — La purification des préparations de botryticine par floculations dans l'alcool et redissolutions successives avaient permis d'obtenir, sinon une substance totalement purifiée, du moins un produit débarrassé d'une partie des surcharges ou impuretés et conservant, certaines précautions prises, la presque totalité de son pouvoir inhibiteur original. Nous avons ici, d'une manière analogue, essayé des extractions successives au charbon activé.

1,8 l de moût pourri est traité au charbon activé. On élue avec 600 cm³ d'une solution phosphatée, qui après centrifugation, est

partagée en deux volumes égaux. Le premier est floculé par l'alcool à 80°. Le second est à nouveau traité au charbon ; on élue comme précédemment, et ce deuxième éluat est floculé à 80° d'alcool. En outre, un volume de 900 cm³ de moût pourri est traité par l'alcool.

Les divers floculats ainsi obtenus sont ajoutés à 150 cm³ de moût de raisin, qui reçoivent ainsi un précipité provenant d'un volume de moût pourri 6 fois supérieur. On fait fermenter.

Le floculat alcoolique du moût pourri empêche toute fermentation même après 2 mois de séjour à l'étuve et nouvel ensemencement (tableau XXV). Le floculat du premier éluat du charbon provoque seulement un retard, mais assez important : l'écart par rapport au témoin est d'une quarantaine de grammes de sucre tout au long de la fermentation. Celle-ci laisse 21 g de sucre non fermenté dans le milieu.

Tableau XXV

Adsorptions par le charbon activé et élutions successives

Moût de raisin à 150 g de sucre par litre. Fermentation à l'abri de l'air.

		2 jours	4 jours	11 jours	1 mois sucre restant
Moût témoin	Sucre fermenté	41	86	141	8,3
	Nombre de levures	*26*	*37*	*43*	
Moût + floculat direct	Sucre fermenté	pas de fermentation			
	Nombre de levures				
Moût + floculat après *une* adsorption par le charbon	Sucre fermenté	2	41	98	11
	Nombre de levures	*8*	*22*	*30*	
Moût + floculat après *deux* adsorptions par le charbon	Sucre fermenté	28	83	141	10
	Nombre de levures	*20*	*30*	*42*	

L'action inhibitrice du floculat alcoolique du deuxième éluat est pratiquement négligeable ; dès le quatrième jour, la marche de la fermentation est identique à celle du témoin.

Les essais de purification de la botryticine utilisant le charbon activé s'accompagnent donc d'une perte de produit telle qu'il n'est pas possible de cette façon de faire des préparations très concentrées et très actives de cet antibiotique.

Nous citerons encore pour mémoire deux essais de purification de la botryticine utilisant la dialyse et l'adsorption sur le phosphate tricalcique.

g) **Dialyse du moût pourri.** — 500 cm³ de moût pourri sont placés

dans une poche de cellophane baignant dans l'eau courante. Après 36 h, il reste encore 2°B de sucre dans le moût. Par phénomène d'osmose, le volume du liquide à l'intérieur de la poche a doublé. On floculе alors le moût dialysé par l'alcool éthylique. Le même volume de moût pourri non soumis à la dialyse est floculé et on détermine l'activité antilevure des deux floculats, après adjonction à 100 cm³ de moût sain.

Le floculat du moût pourri freine comme d'habitude fortement la fermentation, mais l'inhibition est bien plus considérable en présence du floculat du moût pourri dialysé, puisque la fermentation a été empêchée malgré un réensemencement important au septième jour.

Ce fait a pu être observé à nouveau, au cours de plusieurs essais. Donc la botryticine n'est pas dialysable et doit avoir une structure colloïdale, mais il semblerait que par dialyse, on élimine des substances qui s'opposent habituellement à l'action de l'antibiotique.

h) **Adsorption sur phosphate tricalcique.** — On sait que le phosphate tricalcique est utilisé pour la fixation des oxydases, en particulier de la polyphénoloxydase (136). Nous avons essayé d'adsorber la botryticine sur ce support, en opérant à divers pH.

Un volume de 1,3 l de moût pourri est partagé en 6 volumes égaux, qui sont portés à 6 pH différents : 1,5 — 2,5 — 3,5 — 4,5 — 6 et 7.

Chacun d'eux reçoit 75 cm³ d'une suspension dans l'eau de phosphate tricalcique à 35 g par litre. Après 20 minutes d'attente, on centrifuge. On recueille la partie solide qui est éluée avec 150 cm³ d'un tampon phosphaté de pH 9. Les éluats sont ensuite floculés à 80° d'alcool et on essaie leur activité en les ajoutant à 20 cm³ de moût sain.

Ces floculats n'apportent qu'un très léger retard de la fermentation. L'adsorption par le phosphate tricalcique, quel que soit le pH, ne donne donc pas de résultats satisfaisants et on peut penser que la botryticine n'appartient pas au complexe oxydasique et n'est vraisemblablement pas un ferment.

IV. — Production d'inhibiteurs de la fermentation par diverses souches de moisissures

La production de substances antilevures par le *Botrytis cinerea* est une propriété qu'on peut observer pour des cultures de diverses autres moisissures.

Nous avons cultivé sur moût de raisin de 12° Baumé et sur moût de bière différentes souches de champignons : *Aspergillus oryzae, Aspergillus niger, Penicillium urticae, Penicillium notatum, Penicillium chrysogenum, Botrytis albino sclerotia et Botrytis cinerea lini* v. Beyma.

Tableau XXVI

Formation d'inhibiteurs des levures par diverses moisissures

Nature de la moisissure		Cultures sur moût de raisin	Cultures sur moût de bière
Aspergillus oryzae	Moût.	Forte inhibition : au 5e j retard de 61 g de sucre sur le témoin. Population finale diminuée : 36 %.	Pas d'inhibition.
	Extrait de mycélium	Légère accélération.	Très légère accélération.
Penicillium urticae	Moût.	Forte inhibition : au 5e j retard de 69 g de sucre sur le témoin. Population finale diminuée : 27 %.	Légère inhibition : au 4e j retard de 17 g de sucre sur le témoin. Pas d'effet sur le nombre des levures.
	Extrait de mycélium	Légère accélération.	Aucun effet.
Aspergillus niger	Moût.	Pas d'effet.	Pas d'effet.
	Extrait de mycélium	Pas d'effet.	Pas d'effet.
Penicillium notatum	Moût.	Nette inhibition : au 5e j retard de 38 g de sucre sur le témoin. Population finale diminuée : 25 %.	Nette inhibition : au 5e j retard de 37 g de sucre sur le témoin. Population finale diminuée : 34 %.
	Extrait de mycélium	Légère accélération.	Aucun effet.
Penicillium chrysogenum	Moût.		Légère inhibition : au 5e j retard de 30 g de sucre sur le témoin. Population finale diminuée : 30 %.
	Extrait de mycélium		Très légère accélération.
Botrytis albino sclerotia	Moût.	Forte inhibition : au 5e j retard de 63 g de sucre sur le témoin. Population finale diminuée : 38 %.	Forte inhibition : 5e j retard de 64 g de sucre sur le témoin. Population finale diminuée: 36 %.
	Extrait de mycélium	Inhibition : au 5e j retard de 21 g de sucre sur le témoin. Population finale diminuée : 20 %.	Pas d'inhibition.
Botrytis cinerea lini (V. Beyma (1	Moût.		Légère inhibition : 5e j retard de 30 g de sucre sur le témoin. Population finale diminuée : 34 %.
	Extrait de mycélium		Légère accélération.

(1) Les cultures de *P. chrysogenum* et de *B. cinerea lini*, v. Beyma sont difficiles sur moût de raisin.

Après quinze jours de culture, on sépare le liquide du mycélium. On épuise le mycélium broyé par lavage à l'eau. On stabilise ces liquides par chauffage et on amène à 80° d'alcool. Les divers floculats recueillis sont ajoutés à un milieu nutritif selon la technique habituelle. Le tableau XXVI rassemble les observations faites dans chaque cas. Mis à part le cas de *B. cinerea lini* v. Beyma, les Botrytis sont, de toutes les moisissures, celles qui sécrètent le plus d'inhibiteurs des levures. Ces substances se trouvent à la fois dans le milieu de culture et dans le mycélium. L'action antilevure d'*Aspergillus orysae* n'apparaît que lorsqu'il

est cultivé sur moût de raisin et *Aspergillus niger* est absolument sans action. Les mycéliums des divers Penicilliums en sont dépourvus, tandis que leur milieu de culture inhibe plus ou moins les levures.

Nous n'avons pas poursuivi davantage nos recherches dans cette voie, mais il est probable que pourraient être extraits des cultures de certains Penicilliums et Aspergillus des antibiotiques antifongiques, actifs sur les levures, ayant des propriétés semblables à la botryticine.

V. — Conditions de production et d'efficacité de la botryticine

Nos précédentes observations concernant la botryticine s'appliquaient toutes aux cultures de *B. cinerea* sur jus de raisin. Mais le Botrytis peut se développer sur d'autres milieux et souvent avec plus de facilité que sur le moût de raisin qui est trop riche en sucre. La question qui se pose alors est de savoir si la production de substance inhibitrice s'observe quel que soit le milieu. D'autre part, dans nos conditions d'expérience : cultures fixes et ensemencements faibles, le *Botrytis cinerea* se développe lentement à la surface du milieu de culture. Les moûts pourris sont généralement traités en vue de l'extraction de la botryticine au moment où la surface du liquide est entièrement recouverte et où la couleur gris cendré du mycélium indique la formation de conidies. Habituellement, en effet, on sait que la production d'un antibiotique est maximum au moment de la sporulation du champignon. Mais il importe de rechercher s'il en est bien ainsi pour la botryticine. Nous nous attacherons à éclaicir ces deux points et à fixer le moment où la teneur de la culture en botryticine est optimum.

a) **Influence des conditions de pH du milieu de culture.** — Le Botrytis se développe bien sur le moût de raisin à son pH naturel, généralement voisin de 3,5. Dans l'essai suivant, nous cherchons à déterminer si un autre pH ne conviendrait pas mieux à la formation de la botryticine.

On ensemence de spores de Botrytis une série de flacons erlenmeyers contenant le même volume du même moût amené à différents pH par additions d'acide ou de soude : pH 2,8 — 3 — 3,5 — 4,5 et 7. Après trois semaines de culture, le développement est assez variable et le poids de mycélium frais recueilli est un peu différent pour chacun des milieux. Il est plus élevé aux pH inférieurs à 4,0. Le Botrytis se cultive mieux en milieu acide. Du reste, comme cela a été démontré par CHARPENTIÉ (129), le Botrytis pendant sa croissance, par la combustion des acides qu'il provoque aux pH bas et la formation d'acide citrique qu'il produit aux pH élevés, uniformise en quelque sorte l'acidité ionique de son milieu de culture.

Après culture, nous avons amené chacun de ces liquides à pH 3,5,

qui est, on l'a vu, le pH optimum de floculation, et nous l'avons porté à 80° d'alcool. Les floculats obtenus sont essayés sur la fermentation selon la technique habituelle.

Le floculat provenant d'une culture à pH 2,8 ne permet qu'une ébauche de fermentation. Elle ne se manifeste que 10 jours après l'ensemencement et laisse dans le milieu de fortes quantités de sucre non transformées.

Aucune fermentation n'a été possible en présence des floculats des cultures à pH 3,0 et 3,5.

Avec le floculat de la culture à pH 4 l'inhibition observée est moindre : le retard par rapport au témoin au cinquième jour, par exemple, se chiffre à 91 g de sucre. Cependant la fermentation se poursuit jusqu'à complet épuisement du sucre.

Les floculats des cultures à pH 5 et pH 7 ne provoquent qu'un retard très atténué, portant seulement sur une vingtaine de grammes de sucre tout au long de la fermentation.

En définitive, le Botrytis se développant sur moût de raisin donne le maximum de substance inhibitrice à pH 3,0 et pH 3,5. Ce sont précisément les pH naturels du jus de raisin.

b) **Nature et composition du milieu nutritif.** — Nous avons utilisé dans ces essais quatre milieux de base différents : moût de raisin, eau de levure à 20 p. 100, milieu peptoné à 4 g par litre, milieu minéral de RAULIN.

Les milieux à l'eau de levure et à la peptone sont préparés avec 6 variantes, suivant le substrat offert au Botrytis : glucose, lévulose, saccharose à 100 g par litre, amidon à 50 g par litre, acide tartrique à 10 g par litre, acide malique à 20 g par litre. Après 18 jours, les poids de mycélium formés dans chaque condition sont les suivants en g de matière sèche par litre, alors que sur moût de raisin de pH 3,5 on recueille 5,5 g de mycélium.

Substrat	Eau de levure	Milieu peptoné	Milieu de Raulin
Glucose	7	3	9
Lévulose	5,5	3,5	
Saccharose	7	5	
Amidon	8,5	10	
Acide tartrique	9	5,5	
Acide malique	8,5	5,5	

Les liquides de culture sont traités par l'alcool et le pouvoir antibiotique des floculats est essayé sur la fermentation.

Le floculat du moût de raisin a totalement interdit la fermentation. L'inhibition est faible avec les floculats des milieux à l'eau de levure, quel que soit le substrat hydrocarboné. Après un net retard du début de la fermentation, les écarts avec le témoin ont disparu au seizième jour. Les retards provoqués par le floculat des milieux peptonés sont plus importants lorsque le substrat du Botrytis est constitué d'acide malique ou

d'acide tartrique ; avec les milieux sucrés l'inhibition est plus faible ; avec l'amidon elle est inexistante. De même, le floculat obtenu à partir du milieu de RAULIN, malgré une bonne récolte de mycélium, n'a provoqué aucun retard significatif.

Le milieu le plus favorable à la formation de botryticine semble donc être un milieu naturel comme le moût de raisin, à son pH. Mais un milieu à base de peptone donne lieu à des productions intéressantes de botryticine, lorsqu'on fait agir le Botrytis sur les acides malique ou tartrique.

c) **Influence de l'âge de la culture.** — Nous avons cultivé plusieurs souches différentes de *Botrytis cinerea*, à l'étuve à 25°C, dans une série de 5 erlenmeyers d'un litre, contenant 300 cm³ de moût de raisin titrant 12° Baumé. Chacune de ces cultures est traitée après des périodes plus ou moins longues de développement : 6, 8, 14, 21 et 36 jours.

Le mycélium est égoutté et pesé. Finement broyé, on le lave à plusieurs reprises avec de l'eau distillée bouillie. De cet extrait, on retire la botryticine par floculation par l'alcool. Par ailleurs, le moût pourri est traité directement. Pour simplifier, nous ne donnons les résultats détaillés que pour la souche isolée de raisins du Sauternais, les conclusions étant les mêmes pour les autres souches.

Le poids des mycéliums recueillis sur les différentes cultures et l'aspect de celles-ci au moment du traitement, sont donnés ci-dessous.

Durée de la culture	Poids du mycélium frais	Aspect du mycélium
6 jours	4,9 g	Surface recouverte d'un mycélium blanc, pas de conidies.
8 jours	7,5 g	Mycélium grisâtre, commence à sporuler.
14 jours	13,2 g	Mycélium gris foncé, présence de conidies.
21 jours	18,3 g	Mycélium gris foncé, présence de conidies.
36 jours	29,5 g	Mycélium gris foncé, présence de conidies.

Le poids du mycélium augmente en fonction du temps. Le moût de culture est suffisamment riche en substances nutritives, notamment en sucres, pour que le champignon puisse continuer à se développer pendant plus d'un mois.

Cet essai s'est donc poursuivi pendant un temps relativement long. Le milieu de fermentation dans lequel sont ajoutés les divers floculats alcooliques est, bien entendu, le même pour l'ensemble de l'expérience. Afin d'éviter les pertes possibles d'activité inhibitrice des floculats en fonction du temps, ceux-ci ont été essayés dès leur floculation. Aux cinq périodes de culture correspondent cinq séries de fermentation, chacune d'elles comportant son propre témoin. La fermentation de ces cinq témoins s'est déroulée, à peu de chose près, d'une façon identique. La figure 15 représente les courbes de fermentation obtenues.

Après 6 jours de culture, la surface du moût est déjà totalement recouverte d'une mince couche de mycélium blanc. A ce moment, son

pouvoir inhibiteur est déjà assez marqué. Le retard provoqué par le floculat de ce moût de culture est, au sixième jour de la fermentation, de 57 g de sucre par rapport au témoin.

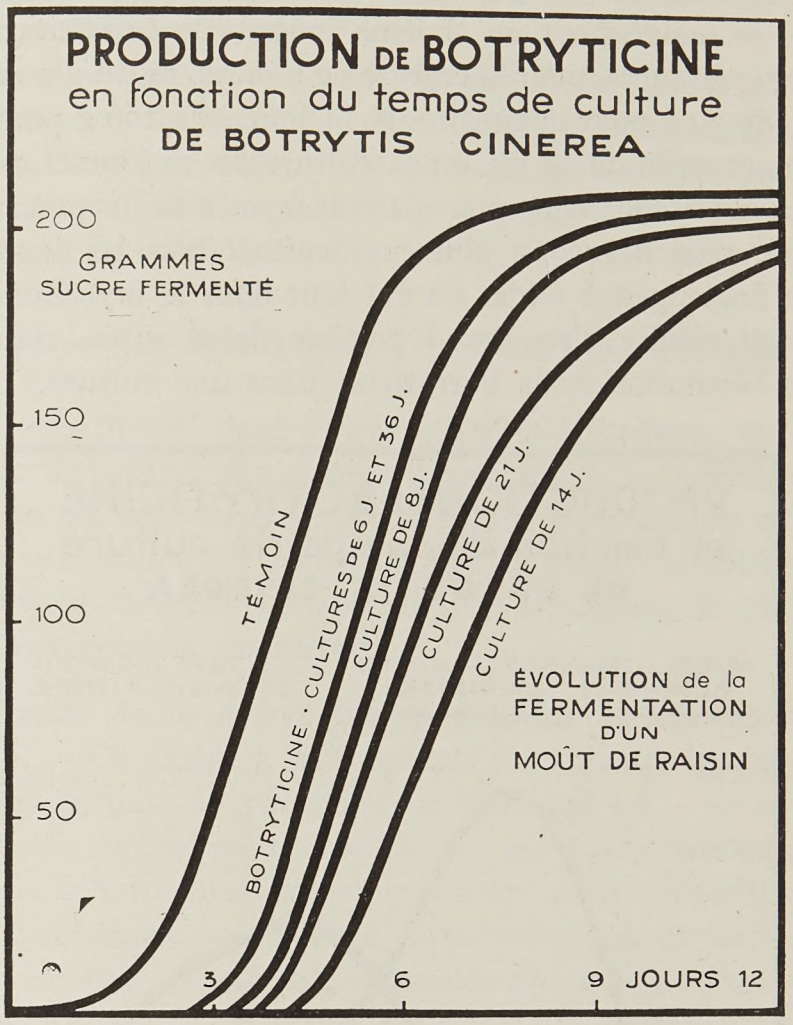


FIG. 15

Après 8 jours de culture, le botrytis commence à présenter des conidies. Le retard provoqué par la botryticine de cette culture est sensiblement plus important, puisque l'écart avec le témoin est ici de 88 g de sucre, toujours au sixième jour de la fermentation.

La botryticine produite dans la culture de 14 jours, au moment où les conidies donnent au mycélium une couleur cendrée, freine la fermentation de telle sorte que l'écart avec le témoin est de 150 g, comparaison faite toujours au sixième jour après l'ensemencement des levures ; la fermentation commence seulement ici alors qu'elle se termine dans le témoin.

Après 21 jours de culture de Botrytis, l'inhibition provoquée par la botryticine commence à diminuer ; elle se chiffre, toujours dans les mêmes conditions, à 100 g seulement. Enfin après 36 jours, la perte de botryticine s'accentue et le retard n'est plus que de 56 g.

La richesse en antibiotique de la culture de Botrytis croît donc du sixième jour au quatorzième jour, soit jusqu'à la sporulation du champignon, puis décroît ensuite progressivement.

La botryticine des extraits aqueux de mycélium provoque des inhibitions qui se manifestent au sixième jour de la fermentation par un retard de 17 g de sucre, pour la culture de 6 jours, de 29 g pour la culture de 8 jours, de 30 g pour la culture de 14 jours, de 106 g pour la culture de 21 jours, et enfin de 78 g pour la culture de 36 jours. La richesse en antibiotique croît donc lentement dans le mycélium jusqu'à la formation des conidies, puis beaucoup plus rapidement dans les jours suivants, et diminue finalement à partir du 21e jour dans le mycélium vieilli. La figure 16 qui résulte d'un grand nombre de mesures, reconstitue les courbes de l'évolution de la botryticine dans une culture.

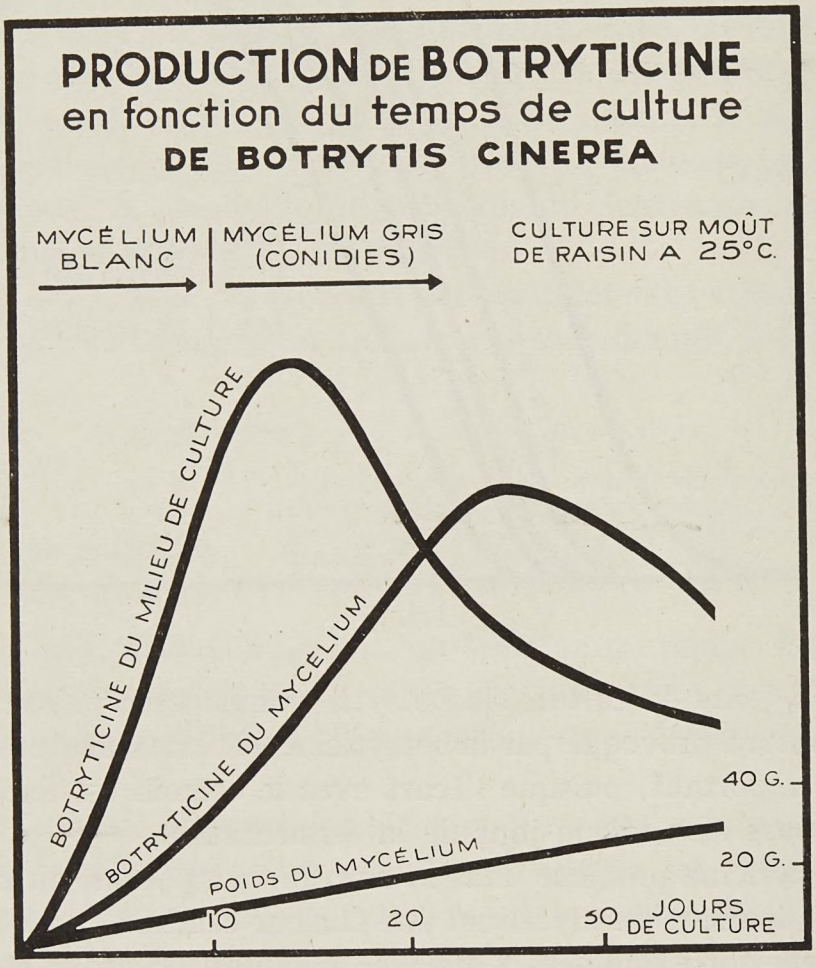


Fig. 16

Nous pouvons résumer les observations faites de la façon suivante :

Dans une culture sur moût de raisin, le poids de mycélium augmente linéairement pendant plus d'un mois sans épuiser totalement le milieu et c'est au moment de la pleine sporulation que le moût de culture du Botrytis est le plus riche en botryticine. Ce n'est qu'un peu plus tard

que la concentration dans le mycélium atteint son maximum. A ce moment le mycélium se trouve plus riche en botryticine que le liquide de culture. Ces variations du pouvoir inhibiteur en fonction de l'âge de la culture constituent, pensons-nous, une nouvelle preuve de l'existence de cet antibiotique antilevure.

Les mêmes observations peuvent être faites lorsqu'on cultive le *Botrytis cinerea* sur un moût de bière. Cependant sur ce dernier, le développement est plus rapide, et le pouvoir antibiotique apparaît plus vite. Le pouvoir inhibiteur maximum reste cependant du même ordre de grandeur que le précédent.

VI. — Conditions optima d'efficacité de la botryticine

Après avoir précisé dans les paragraphes précédents, les conditions de formation, de purification et de conservation de la botryticine, il nous reste à étudier les variations du pouvoir inhibiteur de cette substance en fonction des variations du milieu de fermentation : conditions de pH, nature des sucres à fermenter, présence des facteurs de croissance en plus ou moins grandes quantités.

a) **Efficacité de la botryticine en fonction du pH des milieux de fermentation.** — On amène à différents pH des volumes égaux d'un même moût de raisin titrant 200 g de sucre par litre : pH 2,6 — 3,0 — 4,0 — 5,0 et 6,0. La moitié de chacun de ces volumes, conservée telle quelle, constituera le milieu de fermentation témoin ; l'autre moitié est additionnée de la quantité de botryticine provenant d'un volume triple de moût pourri. On opère également avec un milieu simple contenant 100 g de glucose par litre.

On constate que le pH influe très peu sur la fermentation du moût, mais qu'il agit nettement sur l'activité de la botryticine. C'est ce que montrent les chiffres ci-dessous, qui expriment en g de sucre par litre, les retards des fermentations au douzième jour.

pH	Fermentation du moût de raisin	Fermentation du milieu simple
2,6	91	15
3,0	77	5
4,0	120	51
5,0	134	24
6,0	150	40

La botryticine a donc une action nettement plus forte lorsque le pH est plus élevé, et ceci s'observe aussi bien lorsque le liquide de fermentation est un moût naturel ou un milieu simple. En définitive, la botryticine, qui se forme surtout dans les milieux de culture de pH bas, et s'extrait de même en milieu acide, agit plus fortement sur les levures à un pH un peu élevé.

b) **Influence de la botryticine suivant la nature du sucre fermenté.** — Jusqu'ici, l'action de la botryticine n'a été étudiée que dans la fermentation d'un mélange de glucose et de lévulose. Nous avons voulu voir si l'inhibition était la même en présence d'autres sucres. Nous avons opéré en milieu simple contenant 100 g par litre de l'un des sucres suivants : glucose, lévulose, mannose, galactose, maltose, saccharose, raffinose. 50 cm³ de chacun de ces milieux reçoivent la botryticine séparée par l'alcool provenant de 150 cm³ de moût pourri et on fait fermenter.

On observe de fortes inhibitions quelle que soit la nature du sucre. Les milieux au galactose et surtout au raffinose fermentent lentement et leur retard est encore accentué par addition de botryticine. Glucose, lévulose, mannose, maltose fermentent sensiblement à la même vitesse, mais comparativement, les inhibitions obtenues semblent plus fortes en présence de mannose et de maltose. Le saccharose fermente rapidement et la botryticine provoque en présence de ce sucre un retard très appréciable.

Voici quels sont au onzième jour les retards de fermentation. On les exprime par la différence des poids de sucre fermenté entre le témoin et les milieux additionnés de botryticine : raffinose 18 g ; glucose 38 g ; galactose 42 g ; lévulose 44 g ; saccharose 53 g ; mannose 61 g et maltose 83 g.

La botryticine exerce donc toujours un effet inhibiteur sur les levures quels que soient les sucres fermentés, mais l'importance du retard constaté varie cependant avec la nature de ces sucres.

c) **Efficacité de la botryticine en présence des facteurs de croissance.** — Afin de savoir si la botryticine agissait comme une antivitamine, l'essai suivant a été effectué. On ajoute à des volumes identiques de moût titrant 200 g de sucre par litre, respectivement un excès de l'un des sept facteurs de croissance suivants, aux doses ci-après : 1 mg par litre de thiamine, d'acide p. aminobenzoïque, d'acide nicotinique, d'acide pantothénique, de pyridoxine, 100 γ par litre de biotine, 20 mg par litre de mésoinositol.

La moitié du volume de chacun de ces milieux est gardée comme témoin ; l'autre moitié est additionnée d'une quantité de botryticine provenant d'un volume triple de moût pourri.

On opère de même avec un milieu minéral simple à 100 g par litre de saccharose, contenant déjà les 7 vitamines aux doses ci-après : 0,2 mg par litre de thiamine, d'acide p.aminobenzoïque, d'acide nicotinique, d'acide pantothénique, de pyridoxine, 20 γ par litre de biotine et 10 mg de mésoinositol.

On ensemence et on fait fermenter.

Les moûts sans botryticine fermentent rapidement, avec la même

vitesse. Mais la fermentation est complètement empêchée par la botryticine même en présence d'un excès de thiamine, de mésoinositol, d'acide p.aminobenzoïque ou de pyridoxine. Cependant un excès d'acide nicotinique, d'acide pantothénique ou de biotine permet une légère fermentation, qui reste très incomplète.

En étudiant les besoins vitaminiques de la levure n° 51, nous avons pu voir que seuls la biotine et l'acide pantothénique sont nécessaires à sa bonne croissance dans un milieu synthétique contenant déjà toutes les autres vitamines. Dans ce moût déjà riche cependant en facteurs de croissance, ces vitamines en excès permettent à la levure de lutter, dans une faible mesure, contre l'effet inhibiteur de la botryticine.

Dans le milieu simple, l'addition de botryticine n'a pas été suffisante pour inhiber complètement la fermentation ; elle a été simplement retardée. L'écart avec les témoins est faible. Il n'est que de 10 à 20 g de sucre au quinzième jour ; il est presque inexistant à ce moment en présence d'un excès de mésoinositol, après avoir atteint 39 g au septième jour. En définitive, si l'addition d'un excès de certains facteurs de croissance semble activer la fermentation proportionnellement davantage en présence de botryticine, il ne semble pas qu'on puisse parler d'une action antivitaminique vraie de cet antibiotique.

d) **Conclusions.** — Les moûts provenant de raisins attaqués par le *Botrytis cinerea* ou ayant servi de milieu de culture à ce champignon, fermentent toujours très lentement. Le simple épuisement en substances nutritives pour la levure n'explique pas complètement cette fermentation lente, et il a pu être démontré qu'il y a dans de tels moûts et dans le mycélium de Botrytis, une ou plusieurs substances inhibitrices sensibles à l'anhydride sulfureux et détruites par un chauffage prolongé. Ces substances antibiotiques actives sur les levures ont été appelées « botryticine ».

L'extraction de la botryticine d'un moût de raisin s'opère soit par floculation directe du moût pourri à 80° d'alcool, soit par adsorption sur charbon, suivie d'une élution à pH 9 par un tampon phosphaté et d'une floculation de l'éluat par l'alcool. Dans le premier cas, le floculat obtenu contient deux sortes de substances inhibitrices de la fermentation alcoolique. L'une d'elles se trouve déjà dans le moût de raisin sain, l'autre est caractéristique du moût pourri et constitue la botryticine.

De nombreuses expériences ont été réalisées dans le but de séparer ces deux substances. L'adsorption par le charbon, si elle ne permet pas de conserver tout le pouvoir inhibiteur initial, aboutit cependant dès la première opération à une séparation dans laquelle la botryticine est nettement concentrée. C'est donc sous la forme de floculat alcoolique

provenant de l'extraction par le charbon activé que nous avons poursuivi l'étude de la botryticine.

Dans une série d'essais, nous avons pu établir que le milieu le plus favorable à la formation de botryticine par le *Botrytis cinerea* est le moût de raisin à son pH naturel. Dans nos conditions d'expérience : culture non agitée, ensemencement faible, température de culture 25°C, la concentration en botryticine est maximum dans le moût de raisin servant de culture au moment où apparaissent les conidies. Par la suite, les quantités de botryticine diminuent rapidement dans la culture, à la fois sans doute par moindre production et par destruction de la substance préexistante.

Un pH de fermentation élevé favorise l'effet inhibiteur de la botryticine. Certains facteurs de croissance à fortes doses seraient susceptibles de diminuer son action, sans qu'on puisse invoquer cependant une action antivitaminique de la botryticine.

CONCLUSIONS GÉNÉRALES

Nous ne reproduirons pas ici simplement les conclusions partielles que nous avons données à la fin de chaque chapitre et nous n'énumérerons pas une fois de plus, les faits d'ordre théorique et pratique que nous avons relevés tout au long de ce travail. Nous voulons seulement tirer les enseignements généraux de notre étude.

Nous avons recherché systématiquement les produits susceptibles d'agir comme activeurs ou, au contraire, comme inhibiteurs de la fermentation alcoolique. Depuis les travaux de PASTEUR, on peut dire schématiquement que les pratiques de la vinification reposent sur l'emploi de techniques activant et régularisant les fermentations, en réalisant les conditions les plus favorables au développement des levures, tandis que les pratiques de la conservation des vins tendent, par contre, à empêcher tout développement microbien, en créant des conditions défavorables à la multiplication des levures et des bactéries. La conservation des vins sucrés notamment est assurée par l'emploi d'un antiseptique, l'anhydride sulfureux.

Il est évident que pour utiliser au mieux les levures, il faudrait être en mesure, pour ainsi dire à volonté, d'accélérer leur travail et inversement de le freiner ou de l'empêcher complètement. Cette considération a été le point de départ de notre étude.

Il nous semble qu'une notion primordiale qui éclaire d'un jour nouveau les problèmes pratiques que posent les fermentations, découle de nos travaux : il existe dans le raisin mûr et dans son moût, côte à côte, d'une part des substances qui sont indispensables à la multiplication des levures, et certaines qui en augmentent fortement le rendement de travail, et d'autre part des substances qui freinent leur croissance, jusqu'à

l'interdire complètement. Le raisin pourri, attaqué par le *Botrytis cinerea*, est particulièrement riche en substances appartenant à ces deux catégories qui sont d'ailleurs différentes de celles que présente le raisin sain. Ces observations donnent l'explication de certains aspects encore étranges du phénomène fermentatif, concernant la vitesse de son déroulement dans la pratique. Suivant les concentrations respectives de ces activeurs et inhibiteurs naturels, tantôt la fermentation du moût est rapide et la refermentation du vin facile, tantôt la fermentation est lente, pénible, incomplète et le vin obtenu est relativement stable vis-à-vis des accidents de refermentation.

Si nous ne connaissons pas encore toujours la nature de ces substances, ni les conditions exactes pour lesquelles les activeurs prennent le pas sur les inhibiteurs, et inversement, on peut cependant espérer de cette notion beaucoup de progrès dans le domaine pratique. Obtenir à coup sûr la fermentation complète dans les délais souhaitables, d'un autre côté obtenir des vins biologiquement stabilisés, que ce soit du reste vis-à-vis des levures de refermentation ou des bactéries de maladies, on peut envisager que les solutions de ces deux problèmes seront un jour réalisables, sans le secours d'aucune addition artificielle. Il mérite d'être souligné que la nature nous donne, dans le raisin même, les moyens de réaliser parfaitement sa transformation en un produit biologiquement stable.

Sans attendre la connaissance complète de ces produits du raisin, biocatalyseurs et bioinhibiteurs, étude qui pose des problèmes difficiles de chimie organique, nous avons déjà à notre disposition des substances similaires qui ne proviennent pas du raisin, mais douées de propriétés semblables. L'activeur que synthétise l'*Aspergillus niger* est du même type que celui que produit le *Botrytis cinerea* dans les raisins pourris, et il est probablement voisin des facteurs d'activation qui existent naturellement dans le raisin sain.

Par ailleurs si la botryticine des raisins pourris noble et les substances qu'on peut séparer des jus de raisins sains par simple floculation alcoolique, sont certainement chimiquement très différentes de l'actidione de *Streptomyces griseus*, ces trois substances naturelles présentent des propriétés antilevures communes, plus ou moins intenses, mais toujours réelles.

En outre des observations d'antagonisme levures-bactéries, constatées d'abord de cellule à cellule, mais que possèdent encore les milieux de culture filtrés (93), laissent présager qu'il sera peut-être possible de tirer profit de ces faits d'antibiose pour préserver les vins des maladies microbiennes.

Enfin, du chapitre qui traite des besoins en facteurs de croissance des levures de vin, se dégagent encore des notions essentielles pour la solution de ces mêmes problèmes pratiques. La succession et la coopération dans la fermentation du moût des différents genres et espèces de levures qui

font le vin, les possibilités de refermentation, la sensibilité aux maladies, sont probablement pour une grande part sous la dépendance des teneurs du raisin et du vin en facteurs de croissance. Certaines carences peuvent conduire à une meilleure stabilité biologique. Mais une documentation sur les teneurs en facteurs de croissance, et la connaissance de leur évolution nous manquent encore pour une interprétation complète.

Ainsi notre travail, en plus des solutions pratiques acquises ou très proches, qu'on trouve au long de cet exposé, donne l'explication de faits techniques jusqu'ici incompréhensibles. S'il ne prétend pas résoudre définitivement tous les problèmes posés, il nous semble du moins que se trouve beaucoup mieux tracée la route à suivre désormais dans ces recherches.

BIBLIOGRAPHIE

(1) PEYNAUD (E.) et DOMERCQ (S.). — *Ann. Techn. agric.*, 1953, **4**, 265.
(2) PEYNAUD (E.). — *Rev. Ferm. Ind. alim.*, 1952, **7**, 71.
(3) LAFOURCADE (S.). — *Ind. agric. alim.*, 1954, **71**, 15.
(4) PASTEUR (L.). — *Etudes sur la bière*, 1876.
(5) RIBÉREAU-GAYON (J.). — *Soc. Sci. Phys. Nat. Bordeaux*, juin 1945.
(6) LABORDE (J.). — *Cours d'Œnologie*, Bordeaux, 1907, p. 186.
(7) GAYON (U.). — *Rapport sur la vinification dans les années chaudes*. Bordeaux, 1895. *La vinification dans les pays chauds*. Congrès de Carthage, 1896.
(8) RIBÉREAU-GAYON (J.), PEYNAUD (E.) et LAFOURCADE (S.). — *Ind. agric. alim.*, 1951, **68**, 141.
(9) HEWITT (F. L.). — *Oxydation-reduction potentials in bacteriology and biochemistry*. Livingstone éd., Edimburg, 1950.
(10) EHRLICH (F.). — *Berichte Deuts. Chem. Gesell.*, 1907, **40**, 1027 ; 1911, 44, 139 ; 1912, 45, 883.
(11) STICKLAND (L. H.). — *Biochem. Journ.*, 1934, **28**, 1746 ; 1935, **29**, 288 ; 1935, 29, 889.
(12) R. THORNE (S. W.). — *Wallerstein Lab. Com.*, 1946, **9**, 97 ; 1950, **13**, 319.
(13) BARTON-WRIGHT (E. C.). — *Wallerstein Lab. Com.*, 1952, **15**, 115.
(14) SMYTHE (C. V.). — *Enzymologia*, 1939, **6**, 9.
(15) WINZLER (R. J.), BURCK (D.) et DUVIGNEAU (V.). — *Arch. Biochem.*, 1944, **5**, 25.
(16) MASSART (L.) et HEYMANS (P.). — *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1950, **32**, 879.
(17) VALAIZE (H.). — *Ind. agric. alim.*, 1949, **66**, 349.
(18) PEYNAUD (E.). — *Ind. agric. alim.*, 1948, **65**, 99.
— LAFON. (M.) — *Contribution à l'étude de la formation des produits secondaires de la fermentation alcoolique*. Thèse Sciences Physiques, Bordeaux, 1954.
(19) FLANZY (M.) et BANOS (M.). — *C. R. Acad. Agric.*, 1938, **24**, 98.
(20) VAN LAER (H.). — *Rev. Ferm. alim.*, 1946, **1**, 207 ; 1948, **3**, 194.
(21) LIEBIG (J.). — *Ann. Chim. phys.*, 1871, **23**, 5.
(22) WILDIERS (H.). — *La cellule*, 1901, **18**, 313.
(23) EASTCOTT (E. V.). — *Journ. phys. chem.*, 1928, **32**, 1094.
(24) WILLIAMS (R. J.) et ROEHM. — *Jour. biol. Chem.*, 1930, **87**, 581.
(25) KÖGL (E.) et TÖNNIS (B.). — *Zeits. Physiol. Chem.*, 1936, **242**, 43.
(26) WILLIAMS (R. J.), LYMAN (C. M.), GOODYEAR (G. H.), TRUESDAIL (J. H.) et HOLADAY (D.). — *Journ. Amer. Chem. Assoc.*, 1933, **55**, 2912.

(27) WILLIAMS (R. J.), MITCHELL (H. K.), WEINSTOCK (H. H.) et SNELL (E. E.). — *Journ. Amer. Chem. Assoc.*, 1940, **62,** 1784.
(28) SCHULTZ (A. S.), ATKIN (L.) et FREY (C. N.). — *Journ. Amer. Chem. Assoc.*, 1939, **61,** 1931.
(29) EAKIN (R. E.) et WILLIAMS (R. J.). — *Journ. Amer. Chem. Assoc.*, 1939, **61,** 1932.
(30) ROGOSA (M.). — *Journ. of Bacteriology*, 1943, **46,** 436.
(31) RAINBOW (C.). — *Nature*, 1948, **162,** 5723.
(32) CUTTS (H. S.) et RAINBOW (C.). — *Nature*, 1949, **164,** 2345.
(33) TRIA (E.) et BARNABEI (O.). — *C. R. Congrès Intern. de Biochimie*, 1952, p. 496.
(34) ALEXANDER (B.) et SUBBAROW (Y.). — *Journ. Biochem. Chem.*, 1940, **135,** 341.
(35) WILLIAMS (R. J.), EAKIN (R. E.) et SNELL (E. E.). — *Journ. Amer. Chem. Soc.*, 1940, **62,** 1204.
(36) LEONIAN (L. H.) et LILLY (V. G.). — *Amer. Journ. Botany*, 1942, **29,** 459.
(37) SCHULTZ (A.), ATKIN (L.) et FREY (C. N.). — *Journ. of Bact.*, 1940, **40,** 334.
(38) SCHULTZ (A.), ATKIN (L.) et FREY (C. N.). — *Arch. of Biochem.*, 1947, **14,** 369.
(39) LOCHEAD (A. G.) et LANDERKIN (G. B.). — *Journ. Bact.*, 1942, **44,** 343.
(40) BURKHOLDER (R. R.). — *Amer. Journ. Botany*, 1943, **36,** 206.
(41) BURKHOLDER (R. R.), MCVEIGH (I.) et MAYER (D.). — *Journ. Bact.*, 1944, **48,** 385.
(42) ATKIN (L.) et GRAY (P. P.). — *Bioch. Bioph. Acta*, 1949, **3,** 692.
(43) MOSES (W.) et JOSLYN (M. A.). — *Journ. of Bact.*, 1953, **66,** 197 ; 1953, **66,** 204.
(44) RABINOWITZ (J. C.) et SNELL (E. E.). — *Arch. Bioch. Biophys.*, 1951, **33,** 472.
(45) SCHOPPER (W. H.). — *C. R. Soc. phys. hist. nat. Genève*, 1944.
(46) MENZINSKY (G.). — *Ark. Kem. Sverige*, 1950, **2,** 1.
(47) WHITE (J.) et MUNNS (D. J.). — *Amer. Brewer.*, 1953, **86,** 29.
(48) VERONA (O.). — *Ann. Facolta agrar. Pisa*, 1951, **12,** 105.
(49) WIKEN (T.) et RICHARD (O.). — *Antonie van Leuwenhoek*, 1951, **17,** 209 ; 1952, **18,** 31. *Schweiz. Zeits. Allg. Patho. Bakt.*, 1951, **14,** 560.
(50) PEYNAUD (E.) et DOMERCQ (S.). — *Ann. Techn. agric.*, 1953, **4,** 265.
(51) GENEVOIS (L.) et FLAVIER (H.). — *P. V. Soc. Sci. Phys. Bordeaux*, 30 mars 1939.
(52) PERLMAN (L.) et MORGAN (A. F.). — *Bull. Intern. Vin*, 1946, **187,** 15.
(53) CASTOR (J. G. B.). — *Applied. Microb.*, 1953, **1,** 97.
(54) *Jahresbericht*, 1949-1951. Station de Wädenswill, p. 627.
(55) RIBÉREAU-GAYON (J.) et PEYNAUD (E.). — *C. R. Acad. Agric.*, 1952, **39,** 444.
(55 *bis*) CASAS (J.). — *Ion*, 1954, n° 152.
(56) GARINO-CANINA (E.) et TREVISIOL (E.). — *Xe Congrès Intern. Ind. agric. alim.*, 1954, Madrid.
(57) RIBÉREAU-GAYON (J.) et RIBÉREAU-GAYON (P.). — *Chimie et Industrie*, 1953, **70,** 416 et 694.
(58) RIBÉREAU-GAYON (J.) et RIBÉREAU-GAYON (P.). — *VIIe Congrès Intern. Vigne et Vin*, 1953, Rome.
(59) DUPUY (P.) et FLANZY (M.). — *C. R. Acad. Agric.*, 1954, **40,** 273.
(60) NIELSEN (N.) et HARTELIUS (V.). — *C. R. Labo. Carlsberg*, 1932, **19,** n° 8.
(61) NIELSEN (N.) et HARTELIUS (V.). — *Ibid.*, 1937, **22,** 1 ; *Zeits. ges. Brauwesen*, 1937, **60,** 109.
(62) NIELSEN (N.) et SING-FANG, FANG. — *C. R. Labo. Carlsberg*, 1937, **22,** 141.

(63) KIESSLING (W.). — *Ind. Agric. alim.*, 1949, **66,** 111.
(64) RIBÉREAU-GAYON (J.), PEYNAUD (E.) et LAFON (M.). — *C. R. Acad. Sci.*, 1952, **234,** 757.
(65) Brevets français nos 878.989, 878.990 et 878.991, 10 février 1943.
(66) RIBÉREAU-GAYON (J.), LAFOURCADE (S.) et LAFON (M.). — *Ind. agric. alim.*, 1950, **67,** 477.
(67) GENEVOIS (L.). — *Ann. des ferment.*, 1935, **1,** 86.
(68) RIBÉREAU-GAYON (J.). — *Ann. Falsif. Fraudes*, 1932, **25,** 339.
(69) PEYNAUD (E.) et LAFOURCADE (S.). — *Bull. Intern. Vin.*, 1952, **252,** 110.
(70) WOLF (P. A.). — *Food Technology*, 1950, **4,** 294. — MOSSEL (D. A. A.) et BRUIN (A. S. de). — *Journ. Microb. Serol.*, 1950, **16,** 393. — EECKHAUT (R. G.). — *Fermentatio*, 1952, **5,** 123. — DI CARO (S.). — *Annali sperim. agr.*, 1953, **7,** 1651.
(71) LUNDSGAARD. — *Biochem. Zeits*, 1930, **220,** 8 ; 1932, **250,** 61. — CAYROL et GENEVOIS (L.). — *C. R. Acad. Sci.*, 1931, **192,**, 1494. — GENEVOIS (L.), CAYROL et NICOLAIEFF. — *C. R. Soc. Biol.*, 1933, **112,** 1382.
(72) FALES (F. W.). — *J. Biol. Chem.*, 1953, **202,** 157. — TREVELYAN (W. E.), GAMMON (J. N.), WIGGINS (E. H.) et HARRISON (J. S.). — *Biochem. J.*, 1952, **50,** 303.
(73) PILOD (M.) et CODVELLE (F.). — *Ann. Hyg.*, 1932, **10,** 654. — KLING (A.). — *C. R. Acad. Sci.*, 1932, **194,** 1402. — METALKINOFF (N.). — *C. R. Acad. Sci.*, 1935, **201,** 411.
(74) DELAGE (J. C.). — *Ann. Falsif. Fraudes*, 1923, **16,** 483. — ROOS (L.) et HUGUES (E.). — *Ibid.*, 1924, **17,** 413. — MOREAU (L.) et VINET (E.). — *Ibid.*, 1924, **17,** 477. — FERRE (L.). — *Ibid.*, 1925, **18,** 34.
(75) BANHIDI (Z. G.) et HEULER (H. V.). — *Wallersteins Comm.*, 1952, **15,** 378.
(76) MILLER (E. J.) et HARRISON (J. S.). — *Nature* (London), 1950, **166,** 1035.
(77) PRATT (R.), DUFRENOY (J.), SAH (P. P. T.), ONETO (J.), BRODIE (D. C.), RIEGLEMAN (S.) et PICKERING (V. L.). — *Journ. Amer. Pharm. Assoc.*, 1950, **39,** 127. — RIBÉREAU-GAYON (J.) et PEYNAUD (E.). — *C. R. Acad. Agric.*, 1952, **39,** 479.
(78) PEYNAUD (E.) et LAFOURCADE (S.). — *C. R. Acad. Sci.*, 1953, **36,** 1924.
(79) PEYNAUD (E.). — *Soc. de Phytiatrie*, juin 1954.
(80) KITTLESON (A. R.). — *Analytical Chem*, 1952, **24,** 1173.
(81) ROUBERT (J.). — *C. R. Journée Technique Institut agricole d'Algérie*, 1953, p. 75.
(82) CORDONNIER (M.). — *C. R. Acad. Agric.*, 1954, **40,** 243.
(83) BENEDICT (R. G.). — *The Bot. Review.*, 1953, **19,** 229.
(84) LEBEDEFF (A.). — *Ann. Brass. Dist.*, 1900, **3,** 290.
(85) FERNBACH (A.). — *C. R. Acad. Sci.*, 1909, **142,** 438.
(86) BOULARD (M.). — *C. R. Acad. Agric.*, 1926, **12,** 615.
(87) MALVEZIN (P.). — *Bull. Soc. Chim.*, 1927, **41,** 713.
(88) FERRÉ (L.). — *Ind. agric. alim.*, 1949, **66,** 259.
(89) RIBÉREAU-GAYON (J.), LAFOURCADE (S.) et LAFON (M.). — *Ibid.*, 1950, **67,** 477.
(90) WAKSMAN (S. A.). — *Antagonismes microbiens et substances antibiotiques.* Sédès éd., 1948.
(91) COOK, KREHE, GIERSCH et SCHROEDER. — *Science*, 1941, **93,** 616.
(92) SEIGNEURIN (R.), GARRAZ (G.), ROUX (A.) et SYNDICO (S.). — *Ann. Inst. Pasteur*, 1947, **73,** 81.
(93) KOCH (R.). — *Brasserie et Malterie* (Belgique), 1953, **3,** 250.
(94) KOPACZEWSKI (W.). — *Archiv. microb.*, 1931, **2,** 187.
(95) SOBELS (J. C.). — *Antonie van Leeuwenhock*, 1950, **16,** 123.
(96) MULLER-THURGAU (H.). — *Landwirt. Jahrbücher*, 1888, **17,** 83.

(97) MICHEL (A.). — *Bull. Intern. Vin*, 1946, **185,** 127.
(98) SCHANDERL (H.). — *Die Mikrobiologie des Weines*, Enger Ulmer éd., Stuttgart, 1951, p. 137.
(99) ALEXOPOULOS (G. J.). — *Ohio Journ. Sci.*, 1941, **41,** 425.
(100) KASUYOSHI AISO et coll. — *Journ. of Antibiotics* (Japon), 1951, **4,** 357.
(101) WAKSMAN (S. A.), ROMANO (A. H.), LECHEVALLIER (H.) et RAUBITSCHEK (F.). — *Ier Symposium intern. Chimie microbiol. Genève*, 1952, p. 163.
(102) PEYNAUD (E.) et LAFOURCADE (S.). — *Rev. Ferm. Ind. alim.*, 1953, **8,** 228.
(103) GUERILLOT-VINET, GUYOT (L.), MONTAIGUT (J.) et ROUX (L.). — *C. R. Acad. Sci.*, 1950, **230,** 1424.
(104) WHIFFEN (A. J.), BOHONOS (N.) et EMERSON (R. L.). — *Journ. of Bact.*, 1946, **52,** 610.
(105) BRIAN (P. W.) et coll. — *Journ. gen. Microb.*, 1951, **5,** 619.
(106) FLANZY (M.) et DUPUY (P.). — *Ann. Techn. Agric.*, 1952, **1,** 121.
(107) DUNNSHE (B. R.), LEBEN (C.), KEITT (G. W.) et STRONG (F. M.). — *Journ. Amer. Chem. Soc.*, 1949, **71,** 2436.
(108) HICKEY (R. J.), CORUM (C. J.), HIDY (P. H.), SOHEN (L. R.), NAGEN (E. B.) et KROPP (E.). — *Antibiotics and chemotherapy*, 1952, **12,** 47.
(109) LECHEVALIER (H.), ACKER (R. P.), CORKE (E. T.), HAENSLER (C. M.) et WAKSMAN (S. A.). — *Mycologia*, 1953, **45,** 155.
(110) GOTTLIEB (D.). — *Phytopathology*, 1950, **41,** 393.
(111) SWART (E. A.), ROMANO (A. H.) et WAKSMAN (S. A.). — *Proc. Soc. Exp. Biol.*, 1950, **73,** 376.
(112) HAZEN (E. L.) et BROWN (L.). — *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 1951, **76,** 93.
(113) BRIAN (P. W.). — *Nature* (London), 1944, **154,** 667.
(114) BRIAN (P. W.), CURTIS (P. J.) et HEMMING (H. G.). — *Proc. Roy. Soc.* (Londres), 1947, **135,** 106.
(115) BRIAN (P. W.). — *Ann. Bot.*, 1949, **49,** 59.
(116) MEADA (K.) et coll. — *Journ. of antibiotics* (Japon), 1952, **5,** 405.
(117) WALTON (R. N.) et WOODRUFF (H. B.). — *Journ. clin. Invest.*, 1949, **28,** 924.
(118) LACK (A.). — *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 1949, **72,** 656.
(119) DAVISSON (J. W.), TANNER (J. R.), FINLAY (F. W.) et SOLONIOUS (I. A.). — *Antibiotics and chemotherapy*, 1951, **1,** 289.
(120) HOSOYA (S.), KOMATSU (N.) et SOEDA (M.). — *Journ. of Antibiotics* (Japon), 1952, **5,** 453.
(121) FREEMAN (G. G.) et MORRISSON (R. L.). — *Biochem. Journ.*, 1949, **44,** 1.
(122) BRIAN (P. W.), CURTIS (P. J.), HEMMING (H. G.), UNWIN (C. H.) et WRIGHT (J. M.). — *Nature* (London), 1949, **164,** 534.
(123) FORD (J. H.) et LEACH (B. E.). — *Journ. Amer. Chem. Soc.*, 1948, **70,** 1223.
(124) KORNFELD (E. C.), JONES (R. G.) et PARKE (J. V.). — *Ibid.*, 1949, **71,** 150.
(125) WHIFFEN (A. J.). — *Journ. of Bact.*, 1948, **56,** 283.
(126) PEYNAUD (E.). — *C. R. Acad. Sci.*, 1952, **235,** 1163.
(127) SCHNEIDER (H. G.), TENER (G. M.) et STRONG (F. M.). — *Journ. Amer. Chem. Soc.*, 1953, **75,** 1100.
(128) KIELHOFER (E.). — *Wein und Rebe*, 1953, **35,** 638.
(129) CHARPENTIÉ (Y.). — *Contribution à l'étude biochimique des facteurs de l'acidité des vins.* Thèse Ingénieur-Docteur, Bordeaux, 1954. — *Ann. de Technologie*, 1954.
(130) LABORDE (J.). — *Rev. Vitic.*, 1897, **7,** 524.
(131) MOREAU (L.). — *Rev. Vitic.*, 1902, **26,** 229.

(132) LABORDE (J.). — *C. R. Acad. Sci.*, 1896, **123,** 1074 ; 1898, **126,** 536.
(133) PEYNAUD (E.) et CHARPENTIÉ (Y.). — *Ann. Falsif. Fraudes*, 1953, **46,** 14.
(134) BASTIN (R.). — *Rev. Ferm. Ind. alim.*, 1954, **9,** 15.
(135) BERTRAND (D.). — *VIII*e *Congrès de Chimie biologique*, 1948, p. 185 et 191.
(136) SARKAR (N. K.) et SUMNER (J. B.). — *Enzymologia*, 1951, **14,** 280.
(137) EULER (von) et SWARTZ. — *Zeits. Physiol. Chemie.*, 1924, **140,** 146.
(138) KÖGL et BORG. — *Zeits. Physiol. Chemie*, 1941, **269,** 97.
(139) BRISOU (J.) et GENEVOIS (L.). — *C. R. Soc. Biol.*, 1931, **107**, 865.

PECTINE-METHYLESTERASE ET MATIÈRES PECTIQUES DANS LA POMME ET LA POIRE LEUR IMPORTANCE DANS LA FABRICATION DES CIDRES ET DES POIRÉS

PAR

P. JACQUIN

Station de Recherches pomologiques et cidricoles de Rennes

PLAN DU MÉMOIRE

I. — **Généralités. Présence et propriétés de la pectine- méthylestérase.**

II. — **Mesure de l'activité de la pectine- méthylestérase**

Les différentes méthodes préconisées.
Mode opératoire adopté.
Technique opératoire détaillée.
Importance de la finesse de la pulpe sur le dosage de la P.M.
Unités de mesure de la P. M.

III. — **Résultats expérimentaux**

Dosage des matières pectiques.
Tableaux analytiques.
Pommes de table.
Poires à poiré.
Pommes à cidre.

IV. — **Influence de la maturité sur la teneur en P.M. des pommes et des poires**

V. — **Influence du cuvage et du rémiage sur la teneur des jus en P. M. et en matières pectiques**

VI. — **Étude de quelques préparations diastasiques commerciales**

Sur solution de pectine.
Sur différents moûts de pommes à cidre.

VII. — **Pectine-méthylestérase, pectine et méthanol**

VIII. — **Influence du blettissement des fruits sur la teneur en méthanol**

IX. — **Interprétation technologique**

X. — **Conclusions générales**

XI. — **Bibliographie**

I. — GÉNÉRALITÉS — PRÉSENCE ET PROPRIÉTÉS DE LA PECTINE-MÉTHYLESTÉRASE

Découverte par FREMY (1) en 1840 dans la carotte, cette diastase fut d'abord nommée pectase, car on la considérait alors comme responsable uniquement de la formation d'un gel, par action d'ions bivalents, en particulier du calcium, à partir d'une solution d'acide pectinique. La formation du gel étant une réaction qui n'a aucun rapport avec l'action de l'enzyme, ce terme de pectase a été abandonné, et différents auteurs ont proposé d'autres dénominations, telle pectine-méthoxylase, qui elle aussi est abandonnée actuellement. Von FELLENBERG (2) ayant montré la présence de groupements méthylés dans la molécule d'acide pectinique et TUTIN (3) ayant démontré que l'action spécifique de cette enzyme consistait en une saponification de l'acide pectinique avec libération d'alcool méthylique, la plupart des auteurs utilisent actuellement les termes pectine-estérase ou pectine-méthylestérase. Cette diastase montre une spécificité très poussée dans son action : si par exemple, les groupements méthoxyls de l'acide pectique sont remplacés par du glycol ou du glycérol, ces esters glycolique ou glycérique de l'acide pectinique ne sont pas saponifiés par les pectases d'origines diverses, d'après DEUEL (4).

Étant donné cette extrême spécificité de la diastase, c'est cette dernière dénomination, pectine-méthylestérase, en abrégé P.M. qui convient le mieux pour la désigner et qui doit être retenue, malgré la longueur du mot.

La P.M. se rencontre dans de nombreux végétaux supérieurs appartenant aux familles les plus diverses : luzerne, trèfle, pomme de terre, tomate, tabac, carotte, sureau, lilas, fruits des citrus, etc... Pour les pommes, les opinions sont quelque peu contradictoires : KERTESZ (5) n'a pu mettre cette enzyme en évidence dans son laboratoire, SCHUBERT (6) n'a pu la déceler, ni mesurer son activité dans la pulpe de pomme, mais il opérait par titration alcalimétrique, ce qui permet d'expliquer son échec. Par contre, plusieurs auteurs étrangers (7) ont réussi à déceler et à mesurer l'activité de la P.M. dans les pommes.

La défécation naturelle des moûts de pommes par coagulation spontanée des matières pectiques présentant bien tous les caractères d'un phénomène d'origine diastasique, nous a incité à mesurer l'activité de l'enzyme responsable de cette insolubilisation dans les fruits et les moûts de différentes variétés de pommes à cidre et de table. Cette diastase est également présente dans les cultures de nombreux microorganismes, plus particulièrement de diverses moisissures qui produisent à la fois pectine-glycosidase et pectine-estérase. Le rendement des cultures en ces deux enzymes varie avec l'espèce, la race du microorganisme, et surtout

avec les conditions de culture, en particulier le pH. En faisant varier celles-ci, on peut arriver à orienter la production vers la formation presque exclusive de l'une ou de l'autre diastase. Il est à remarquer que l'action de ces deux enzymes s'interpénètre et se complète, et il est démontré que leur présence simultanée est nécessaire dans les préparations commerciales d'enzymes de filtration. La pectinase ne peut scinder la chaîne des acides polygalacturoniques qu'après saponification des groupements méthyl esters par la pectine-estérase (6). Celle-ci prépare et accélère donc la dégradation de l'acide pectinique par la pectine-glycosidase.

De plus, la saponification de l'acide pectinique libérant des groupements carboxyls, l'acidité du milieu augmente, ce qui favorise l'activité de la pectine-glycosidase. Par contre, en présence de sels de métaux polyvalents, du calcium par exemple, la pectine-méthylestérase provoque une floculation de la pectine à faible degré d'estérification. Cette pectine coagulée est alors susceptible de résister à l'attaque de la pectine-glycosidase.

Les P.M. de diverses origines se différencient par leurs conditions optimum d'activité, et plus particulièrement par leur zone de pH optimum. Alors que les pectine-estérases d'origine fongique montrent un optimum d'activité pour une zone d'acidité nette : pH de 4,3 à 5,0, suivant l'origine (8), les pectine-méthylestérases extraites des végétaux supérieurs ont un optimum d'activité se situant aux environs de la neutralité à partir de pH 6,5, suivant les végétaux et les auteurs, cet optimum pouvant aller jusque pH 8,0. Mais il est cependant difficile d'étudier et d'apprécier l'influence du pH dès qu'on atteint la zone d'alcalinité, car à ce moment, l'action saponifiante de l'alcali s'ajoute à celle de la diastase : ceci rend difficile l'interprétation des résultats observés. Enfin, en plus de la notion pH, l'action de la concentration en cations exerce aussi une influence sur l'activité diastasique.

La P.M. des végétaux supérieurs résiste mieux à la chaleur que celle d'origine fongique (9). Ainsi la P.M. extraite de tomate ou de feuilles de tabac supporte un chauffage de 55° pendant une heure à pH 4 à 6 sans perdre son activité (10), tandis qu'à 30° l'enzyme fongique subit déjà une perte notable d'activité, qu'elle perd d'ailleurs entièrement à 62° ; par contre, la P.M. de tomate chauffée à cette température à pH 6,5 conserve encore 50 p. 100 de son activité et ne la perd entièrement qu'à 80°. Cette résistance à la chaleur varie d'ailleurs avec les conditions d'expérience, pH et concentration en sels. Par contre, l'enzyme fongique résiste mieux aux réactifs chimiques en général, à l'éthanol en particulier, que la P.M. des végétaux supérieurs ; il ne peut donc être question d'employer l'éthanol pour l'extraction et la purification de la P.M. des plantes.

II. — MESURE DE L'ACTIVITÉ DE LA PECTINE-MÉTHYLESTERASE

LES DIFFÉRENTES MÉTHODES PRÉCONISÉES

Nous avons donné le principe de la méthode adoptée dans une note présentée l'an dernier à l'Académie d'Agriculture de France (11). La pectine-méthylestérase étant l'enzyme spécifique de la saponification des groupements méthylés des acides pectiniques, nous avons pensé que la mesure d'activité la plus logique de cette diastase était celle basée sur le dosage du méthanol libéré dans des conditions d'action bien définies. Nous pensons que cette méthode est préférable, parce que plus spécifique et aussi plus sensible, que celles qui sont basées sur la titration des groupes carboxyl libérés par l'enzyme ; cette titration, à l'aide d'un pH-mètre, est rapidement effectuée et peut être avantageuse lorsqu'on opère sur une préparation enzymatique concentrée. Lorsqu'on opère sur un milieu pauvre en P.M. comme la pomme, et de plus sur un milieu fortement tamponné et en présence d'acide malique, il est à craindre que ce mode de titration ne soit bien délicat, sinon impossible à effectuer même avec un pH-mètre très sensible ; cette dernière opinion étant celle de W. Reid (12).

C'est pourquoi nous avons accordé la préférence à une méthode basée sur le dosage du méthanol ainsi que l'ont proposé A. Pollard et Margaret E. Kieser (7), d'autant que nous disposons d'une méthode de microdosage colorimétrique du méthanol (12) suffisamment sensible et précise, bien adaptée à cet usage.

Mode opératoire adopté

Principe de la méthode. — On fait agir un certain poids de pulpe ou un certain volume de jus sur une solution de pectine tamponnée à pH 6,5, la durée du contact étant limitée à 1 heure, et la température fixée à 18°. On distille ensuite en milieu acide et dose le méthanol dans le distillat. Afin de tenir compte du méthanol pouvant préexister dans le matériel en expérience, on opère également une distillation de cette matière, sans contact avec la solution de pectine. Pour se mettre à l'abri d'une erreur provenant d'une saponification partielle de la solution de pectine, on distille également le même volume de cette solution dans les mêmes conditions, puis on fait les corrections nécessaires, s'il y a lieu.

Solution nécessaire :

Solution de pectine à 5 g par litre tamponnée à pH 6,5.

composition de la solution tampon :

Phosphate disodique à 12 H_2O	12,1 g
Phosphate monopotassique	3,2
Chlorure de sodium	5,85
Oxalate de sodium	2,01
Benzoate de sodium	1,25
Eau distillée q. s. p.	1000 cc

Pour obtenir une bonne dissolution de la pectine, on porte la solution tampon à 45-50°, puis on fait tomber en pluie, par petites quantités, les 5 g de pectine en poudre, la solution étant vivement agitée par un agitateur mécanique. On poursuit l'agitation encore plusieurs minutes après l'addition de la pectine. Nous avons utilisé la pectine fournie par la Société Unipectine qualité « Ruban Brun », cette qualité étant celle présentant le plus haut degré d'estérification (75 à 80 p. 100) (1).

Nous conservons la solution de pectine à la chambre froide, mais sans la garder plus de 15 jours.

Technique opératoire détaillée

Pour le dosage de la P.M. dans la pulpe, nous partons d'une râpure obtenue avec une râpe mécanique de laboratoire. Puis cette râpure est ensuite passée au Turmix pour obtenir une bouillie aussi fine que possible. On pèse alors dans un tube de Borel un poids voisin de 20 g de cette râpure fine et on l'additionne de 50 cc de la solution de pectine tamponnée ; lorsqu'on travaille sur des pommes acidulées ou sur des poires à poiré, il faut vérifier le pH du mélange et le ramener si nécessaire, à pH 6,5 à l'aide d'une solution de NaOH N/1. Nous opérons ce contrôle du pH par touche sur du papier Johnson, qui donne une précision suffisante. Il faut évidemment éviter une alcalinisation du mélange, car elle provoquerait une saponification de la pectine. On abandonne alors le tout pendant 1 heure à la température de 18°C. Après ce temps de contact, on transvase, en s'aidant d'un jet de pissette, le contenu du tube de Borel dans un ballon à distiller ; on ajoute le volume d'acide sulfurique N/1 nécessaire pour ramener le pH à 3,3-3,5 (de 2,5 à 3 cc), puis quelques grains de pierre ponce et 2,5 cc d'alcool absolu. On attelle le ballon au réfrigérant et recueille le distillat dans une fiole jaugée de 100. Nous obtenons ainsi l'échantillon A.

Parallèlement à cette opération, on effectue une distillation sur un poids d'environ 20 g de la même pulpe broyée au Turmix, en présence de 2,5cc d'alcool absolu, mais sans contact préalable avec la solution de pectine. Le distillat recueilli dans une fiole jaugée de 100 cc constitue l'échantillon B.

Enfin, pour se mettre à l'abri d'une erreur provenant d'une déméthylation partielle de la solution de pectine, on opère également une distillation sur 50 cc de cette solution ramenée à pH 3,3-3,5 et additionnée de

(1) Que cette Société, veuille bien trouver ici tous nos remerciements pour cette fourniture.

1,25 cc d'alcool pur ; on recueille le distillat dans une fiole jaugée de 50 cc, ce qui nous donne l'échantillon C.

On ne vérifie pas la solution de pectine pour chaque dosage, mais pour chaque série effectuée le même jour. Cette vérification est nécessaire, car le distillat de la solution de pectine nous a toujours donné un peu de méthanol et la teneur en méthanol augmente au cours de la conservation de la solution pectinée, ce qui montre que même à pH 6,5 la pectine est légèrement saponifiée ; cette déméthylation augmente évidemment avec le temps, c'est pourquoi la solution pectinée ne doit être préparée que pour une durée d'une quinzaine de jours ; on peut préparer une plus grande quantité de la solution tampon qui sera additionnée de pectine au fur et à mesure des besoins.

On procède alors au dosage colorimétrique du méthanol sur chaque distillat suivant la méthode décrite en détail précédemment (13).

Connaissant les teneurs en méthanol par cc de chaque distillat, il ne reste plus qu'à remonter par un calcul simple à la teneur de l'échantillon analysé en pectase.

Nous allons donner un exemple numérique pour faciliter la compréhension des corrections faites.

Supposons que nous avons eu les données suivantes :

	Poids de pulpe distillée	Lecture au colorimètre	Méthanol en γ par cc de distillat	Méthanol en mg dans le distillat total
Distillat A.....	20,450	306	99,5	9,950
Distillat B.....	20,410	53	32	3,200
Distillat C (pectine)		14	13,7	0,685

On déduit de la quantité de méthanol trouvée pour A, la quantité de méthanol provenant de la distillation de la pectine (C). Ce qui nous donne pour 20,45 g de râpure : 9,950-0,685 = 9,265 mg de méthanol.

Soit pour 1 g de pulpe : 9,265 /20,45 = 0,453 mg de méthanol.

Le distillat B, renferme 3,200 mg de méthanol qui existait préalablement dans les 20,410 g de pulpe, soit pour 1 g de pulpe : $\frac{3.200}{20,410} = 0,1568$ de méthanol.

La pectase contenue dans 1 g de pulpe a donc libéré au cours de l'opération 0,4530 — 0,1568 = 0,2962 mg de méthanol.

C'est ce chiffre qui mesure l'activité diastasique de la pectine-méthylestérase de l'échantillon analysé.

Dans le cas du dosage de la pectase dans les jus, on opère sur 25 cc de moût (au lieu d'une vingtaine de g) dans les mêmes conditions indiquées ci-dessus pour le dosage dans la pulpe et on effectue évidemment les mêmes corrections.

Importance de la finesse de la pulpe sur le dosage de la P. M.

La pectine-estérase étant fortement adsorbée par les composants cellulaires insolubles dans l'eau, les jus de pression et les extraits de macération ne renferment souvent qu'une fraction, parfois très faible, de la totalité de cette enzyme présente dans le tissu végétal étudié. Ce fait est une cause supplémentaire pouvant expliquer pourquoi certains auteurs ont trouvé de la P.M. dans un produit végétal, comme la pomme par exemple, tandis que d'autres auteurs n'ont pu y déceler sa présence.

Avant d'entreprendre nos séries d'analyses sur les fruits, nous avons tout d'abord étudié ce point afin de nous placer dans les meilleures conditions d'extraction de la diastase.

Nos essais préliminaires nous ont tout d'abord confirmé que la quantité de P.M. décelée dans la pulpe était toujours beaucoup plus importante que celle trouvée dans le jus de pression de cette même pulpe.

Nous avons aussi pensé que la finesse de la râpure devait jouer un rôle dans la diffusion de la diastase. Il est en effet logique de supposer que plus une râpure sera fine, plus le tissu cellulaire sera dilacéré finement et mieux la diffusion de la P.M. pourra s'opérer.

Nous avons donc effectué des mesures de P.M., d'une part sur la râpure donnée par la râpe mécanique de laboratoire, d'autre part sur cette râpure réduite en bouillie dans un Turmix et enfin sur le jus de pression de la râpure.

Le tableau suivant rassemble les résultats obtenus sur pommes à cidre et poires à poiré :

TABLEAU I

Méthanol libéré par la P.M.

Variétés analysées	En mg par g de pulpe		En mg par cc de jus de pression	Unités de P.M.		
	Râpure ordinaire	Râpure passée au Turmix		Râpure ordinaire	Râpure passée au Turmix	Jus de pression
Pommes à cidre :						
Reine des Hâtives	0,061	0,095	0,004	1,90	2,97	0,12
Reine des Hâtives (blondes)	0,214	0,397	0,012	6,68	12,40	0,37
Bedange (17 sept.)	0,062	0,162	0,010	1,93	5,06	0,31
Bedange (10 oct.).....	0,024	0,059	0,008	0,75	1,84	0,25
Blanc Mollet (8 sept.)	0,086	0,188	0,010	2,68	5,87	0,31
Blanc Mollet (blondes) ...	0,486	0,518	0,380	15,18	16,18	11,87
Binet Violet (17 sept.) ...	0,102	0,129	0,006	3,18	4,03	0,18
Binet Violet (10 oct.)	0,064	0,121	0,004	2,00	3,78	0,12
Poires à poiré :						
Graneville.....	0,051	0,085	0,012	1,59	2,65	0,37
Gros Blot (blettes)	0,082	0,089	0,052	2,56	2,78	1,62
Mathéaux (blettes)	0,100	0,108	0,072	3,12	3,37	2,25
Navet (mûres).....	0,122	0,169	0,032	3,81	4,96	1,00
Negel (blettes)	0,458	0,458	0,252	14,31	14,31	7,87
Plant de Blanc	0,016	0,022	0,006	0,50	0,68	0,18
Souris	0,015	0,028	0,007	0,46	0,87	0,21

D'après ce tableau, on peut conclure que la finesse de la râpure a bien une action sur la libération de la P.M. hors des cellules végétales. Plus la pulpe est hachée finement par le Turmix, meilleur est le résultat du dosage de la P.M. Les différences observées sont parfois très importantes puisque le dosage de la P.M. peut plus que doubler pour certaines variétés de pommes lorsqu'on broye la pulpe râpée au Turmix. On constate aussi que la pulpe de poire libère plus facilement la diastase, puisque les différences sont moins importantes entre la râpure et la pulpe passée au Turmix. Enfin, pour les poires comme pour les pommes, la diffusion de la diastase est grandement améliorée lorsque les fruits sont blets. Il y a alors une double constatation à faire : les pommes blondes et les poires blettes sont d'une part beaucoup plus riches en P.M. et d'autre part celle-ci diffuse beaucoup plus facilement des cellules que lorsqu'il s'agit de fruits sains, les écarts entre dosage sur râpure et dosage sur pulpe dilacérée au Turmix sont beaucoup plus faibles, les résultats étant parfois pratiquement identiques. Dans le cas de ces fruits blets, la diastase passe également plus facilement dans le jus de pression.

Cette première série d'analyses avait pour but d'étudier les modalités de diffusion de la P.M. Nous avons constaté et vérifié que cette diastase est réellement très fortement adsorbée par les composés cellulaires insolubles et qu'une dégradation très poussée facilite la libération de la P.M. Nous avons tenu compte de ces essais préliminaires et tous les dosages de la P.M. sur pulpe ont été entrepris sur la râpure ordinaire dilacérée ensuite le mieux possible au Turmix, comme nous l'indiquons précédemment dans la technique opératoire.

Unités de mesure de la P. M.

Au lieu d'exprimer l'activité diastasique de la P.M. en fractions de mg de méthanol libéré, nous avons pensé plus séduisant de convertir cette quantité de méthanol en chiffres plus simples, à l'aide d'une unité bien choisie et en rapport avec nos conditions d'expérience. La plupart des auteurs qui ont étudié cette diastase ont poursuivi leurs travaux sur des préparations enzymatiques évidemment beaucoup plus riches en diastase que les produits végétaux naturels.

Ils ont donc été amenés, ce qui se conçoit fort bien, à exprimer l'activité de la P.M. par des unités très élevées. Par exemple, POLLARD (7) définit l'unité de pectase comme la quantité de pectase contenue dans 1 g de substance et capable de libérer 32 mg de méthanol par minute à 18°C et à pH 6,5-6,7. Par contre SCHUBERT (6), qui mesure l'activité pectasique par titration potentiométrique des groupements carboxyl libérés à pH 4,0 à la température de 30°, définit les unités d'estérase d'une préparation diastasique comme le centuple de la quantité de soude N/10

utilisée après 30 minutes de contact de 1 g de la préparation diastasique avec 50 cc de solution de pectine à 1 p. 100. 1 unité de SCHUBERT correspond donc à $\frac{3,2}{100}$ mg de méthanol libéré en 30 minutes à pH 4,0.

Tenant compte de la faible teneur des pommes en pectine-méthylestérase d'une part, et de nos conditions d'expérience d'autre part, nous avons défini « une unité de pectase comme étant la quantité de pectine-méthylestérase contenue dans 1 g de produit et capable de libérer 0,032 mg de méthanol pendant un contact d'une heure à 18° avec 50 cc de solution de pectine à 0,5 p. 100 tamponnée à pH 6,5 ».

Cette unité ainsi choisie est voisine de celle définie par SCHUBERT, puisque toutes deux se rapportent à la même quantité de méthanol, mais libérée dans des conditions expérimentales différentes : temps double pour notre unité, mais température moins élevée et pH voisin de la neutralité, ce qui se rapproche mieux de la zone de pH optimum de cette enzyme, lorsqu'il s'agit de la doser dans les produits végétaux : en effet le pH optimum se situe, pour la pectase des végétaux supérieurs, aux environs de la neutralité, ainsi que nous l'avons écrit précédemment.

III. — RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX

Nous avons appliqué cette méthode d'évaluation du pouvoir diastasique de la P.M. à différentes variétés de pommes de table et à cidre et de poires à poiré. Nous avons travaillé à la fois sur la pulpe et sur le jus de pression pour certaines variétés. Mais pour les pommes à cidre, le temps nous manquant, nous n'avons testé que le jus de pression.

DOSAGE DES MATIÈRES PECTIQUES

Toutes les fois qu'il nous a été possible, nous avons, parallèlement à la mesure d'activité de la P.M., effectué l'analyse des matières pectiques du jus de pression, d'après les données de DEUEL, en appliquant la méthode employée par PEYNAUD pour les jus de fruits (14).

Méthode de dosage. — 50 cc de jus légèrement centrifugé sont acidifiés par 2,5 cc d'HCl au 1/2 puis amenés à un titre alcoolique de 80° par addition de 260 cc d'alcool à 96° ou de 210 cc d'alcool absolu.

On agite et abandonne au repos à l'armoire frigorifique pendant 3 à 4 jours. On décante alors l'alcool limpide et recueille le précipité par centrifugation. On le lave ensuite 3 fois avec 25 à 30 cc d'alcool à 80° pour chaque lavage, dans le tube du centrifugeur.

Puis on redissout le précipité de matières pectiques dans 50 cc d'eau bouillie tiède, et précipite à nouveau par 200 cc d'alcool absolu ou 250 cc

d'alcool à 96°. On laisse reposer 24 heures et décante en s'aidant de la centrifugation ; puis on lave le précipité à l'alcool à 80°.

On redissout finalement le précipité de matières pectiques dans de l'eau bouillie tiède et on amène le volume total à 100 cc.

— sur 50 cc de cette solution on dose l'extrait sec et les matières minérales.

— sur 50 cc on titre l'acidité à la soude N /20 en présence de phénolphtaléine, soit n le nombre de cc utilisé.

$n \times 0{,}352$ = acide pectique libre en g /litre.

On ajoute alors à cet essai 25 cc de soude N /20, on bouche, agite, et laisse en contact au moins 2 heures à la température ambiante. On neutralise alors la soude ajoutée par 25 cc de SO_4H_2 N /20 et titre à la soude N /20 — soit n' le volume de solution alcaline utilisée.

$n' \times 0{,}380$ = acide pectique estérifié en g /litre.

Enfin, ce liquide est concentré, transvasé dans une fiole d'attaque Kjeldahl pour y doser l'azote.

La teneur trouvée en azote $\times$ 6,20 donne la teneur du précipité de pectine en protéines entraînées par la précipitation à l'alcool.

L'extrait sec donne la teneur en *matières pectiques brutes*. On en déduit les matières minérales et les protéines, ce qui donne les *matières pectiques totales*.

La somme *Acide Pectique libre + Acide Pectique estérifié = Pectine pure*.

La différence entre Matières Pectiques totales et Pectine pure correspond au résidu non pectine : gommes, etc... précipitables à l'alcool.

Le rapport sur 100 entre la pectine pure et les matières pectiques totales est l'*indice de pureté*.

L'*indice d'estérification* est le rapport pour 100 entre l'acide pectique estérifié et la pectine pure.

Les résultats obtenus sont consignés dans les tableaux II, III, et IV.

IV. — INFLUENCE DE LA MATURITÉ SUR LA TENEUR EN P. M. DES POMMES ET DES POIRES

Au cours de la campagne 1953-54, la teneur en pectase des pommes à cidre « Amère de Berthecourt » et « Binet Violet » ainsi que de deux poires à poiré « Graneville » et « Petit Roux » a été suivie depuis le mois de septembre jusqu'à pleine maturité et surmaturité des fruits.

Il a été procédé au dosage de la pectase dans la pulpe et dans le jus de pression, ainsi qu'au dosage de la pectine dans le jus.

Les résultats obtenus sont consignés dans les tableaux V, VI, VII, et VIII.

Tableau II

Pommes de table

Variétés	Dans la pulpe				Dans le jus							
	Méthanol en mg par g				Méthanol en mg par cc.				Matières Pectiques g par litre			
	Total	Préexistant	Libéré par la P. M.	Unités de P.M.	Total	Préexistant	Libéré par la P. M.	Unités de P.M.	Pectine pure	Acide pectique libre	Acide pectique estérifié	Indice d'estérification
Berlepsch Goldreinette	0,077	0,043	0,028	0,87	0,024	0,014	0,010	0,31	2,124	0,300	1,824	85,8
Gravenstein	0,143	0,064	0,079	2,46	0,107	0,058	0,049	1,51	2,667	0,387	2,280	85,5
Grimes Golden	0,411	0,031	0,380	11,90	0,030	0,006	0,024	0,75	2,591	0,387	2,204	85,0
Kendall	0,229	0,041	0,188	5,87	0,050	0,018	0,032	1,00	2,328	0,352	1,976	84,8
King David	0,051	0,037	0,014	0,44	0,030	0,020	0,010	0,31	1,164	0,176	0,988	84,9
Macoun	0,194	0,041	0,153	4,77	0,057	0,021	0,036	1,12	1,614	0,246	1,368	84,7
Maïden Blush	0,162	0,019	0,143	4,60	0,065	0,050	0,015	0,47	2,743	0,387	2,356	85,8
Mildose	0,145	0,042	0,103	3,22	0,090	0,058	0,032	1,00	2,930	0,422	2,508	85,6
Orléans	0,143	0,038	0,105	3,27	0,039	0,012	0,027	0,84	1,763	0,281	1,482	84,1
Paragon	0,115	0,012	0,103	3,22	0,044	0,004	0,040	1,25	2,568	0,440	2,128	82,8
Reinette d'Armorique	0,117	0,037	0,080	2,50	0,040	0,013	0,027	0,84	1,955	0,264	1,691	86,5
Staymann Winesap	0,070	0,014	0,056	1,75	0,026	0,000	0,026	0,81	1,839	0,281	1,558	84,7
Sum Champion	0,121	0,026	0,095	2,96	0,047	0,012	0,035	1,09	3,078	0,475	2,603	84,5
Sweet Mac Intosh.	0,400	0,043	0,357	11,15	0,039	0,015	0,024	0,75	3,059	0,475	2,584	84,4
Winter Banana	0,276	0,010	0,266	8,31	0,030	0,002	0,028	0,87	2,366	0,352	2,014	85,1
York	0,191	0,037	0,154	4,83	0,050	0,013	0,037	1,16	2,284	0,422	1,862	81,5

Tableau III

Poires à poiré

Variétés	Dans la pulpe				Dans le jus							
	Méthanol en mg par g				Méthanol en mg par cc				Matières pectiques g par litre			
	Total	Préexistant	Libéré par la P. M.	Unités de P. M.	Total	Préexistant	Libéré par la P. M.	Unités de P. M.	Pectine pure	Acide pectique libre	Acide pectique estérifié	Indice d'estérification
Chenevières (Blettes)	1,080	0,382	0,698	21,81	0,960	0,424	0,536	16,75	2,609	0,633	1,976	75,7
Coignet (Blettes)	0,274	0,144	0,130	4,06	0,184	0,129	0,055	1,72	0,568	0,140	0,428	75,3
Graneville	0,194	0,130	0,064	2,00	0,027	0,026	0,001	0,03	traces indosables			
Graneville (Blettes)	0,517	0,150	0,367	11,46	0,302	0,119	0,183	5,72	1,344	0,280	1,064	79,1
Muscadet	0,240	0,112	0,128	4,00	0,140	0,109	0,031	0,97	0,356	0,052	0,304	85,4
Petit Roux	0,042	0,012	0,030	0,93	0,004	0,002	0,002	0,06	traces indosables			
Petit Roux (Blettes)	0,187	0,114	0,073	2,28	0,166	0,134	0,032	1,00	1,172	0,317	0,855	72,9
Rousset (Blettes)	0,956	0,416	0,540	16,87	0,772	0,431	0,341	10,65	0,428	0,105	0,323	75,4
Souris	0,065	0,037	0,028	0,87	0,028	0,080	0,020	0,62	traces indosables			

TABLEAU IV. —

Pommes à cidre

Variétés	Origine	Méthanol en mg par cc de jus			Unités de pectine-estérase	Matières pectiques en g par litre					Défécation
		Total	A la sortie de la presse	Libéré par la pectine-estérase		Matières pectiques brutes	Pectine pure	Acide pectique libre	Acide pectique estérifié	Indice d'estérification	
Avalou Beleien	Finistère.	0,032	0,015	0,017	0,53	1,000	0,471	0,053	0,418	88,7	Forte défécation par le bas.
Barrière	Calvados.	0,052	0,040	0,012	0,37	2,040	1,447	0,193	1,254	86,6	Bonne défécation par le bas en 10 jours.
Bédange	Morbihan.	0,061	0,037	0,024	0,75	1,216	0,991	0,193	0,798	81,5	Fort dépôt de lies.
Blanc Mollet	Ille-et-Vilaine.	0,060	0,045	0,015	0,47	1,120	0,790	0,106	0,684	86,6	Défequé par le bas en 5 jours.
Brémontier n° 1	Seine-Inférieure.	0,122	0,085	0,037	1,15	0,152	0,111	0,035	0,076	68,5	Légère défécation par le haut en 48 heures.
Brémontier n° 2	Seine-Inférieure.	0,085	0,057	0,028	0,87	0,196	0,130	0,035	0,095	73,1	Légère défécation par le haut en 3 jours.
Cadudal	Morbihan.	0,108	0,052	0,056	1,75	1,684	1,113	0,125	0,988	88,7	Pris en masse le 4e jour.
Cazo Gris	Morbihan.	0,120	0,067	0,053	1,65	0,268	0,150	0,035	0,115	76,6	Léger dépôt de lies (pomme aigre).
Coquerelle	Ille-et-Vilaine.	0,410	0,162	0,248	7,75	1,832	1,526	0,200	1,326	86,7	Pris en masse en 24 heures.
Domaines du Calvados	Morbihan.	0,094	0,085	0,009	0,28	1,460	1,180	0,357	0,823	69,7	Forte défécation en 8 jours, chapeau bien monté.
Douce Glaz	Morbihan.	0,216	0,143	0,073	2,28	2,816	1,800	0,317	1,483	82,4	Pris en masse en 48 heures, forte défécation.
Doux Amer Gris	Ille-et-Vilaine.	0,328	0,201	0,127	3,96	2,808	1,725	0,281	1,444	83,7	Pris en masse en 48 heures, forte défécation.
Doux Coursier	Ille-et-Vilaine.	0,254	0,121	0,133	4,15	1,312	0,825	0,141	0,684	82,9	Forte défécation par le bas.
Doux Crasseux	Ille-et-Vilaine.	0,014	0,012	0,002	0,06	1,880	1,320	0,140	1,180	89,3	Défécation légère par le bas.
Doux Lalouët	Ille-et-Vilaine.	0,236	0,169	0,067	2,09	2,248	1,580	0,210	1,370	86,6	Pris en masse en 48 heures, bonne défécation.
Doux de la Launette	Morbihan	0,060	0,048	0,012	0,37	0,660	0,556	0,176	0,380	68,3	Bonne défécation en 12 jours, chapeau bien monté.
Doux Normand	Côtes-du-Nord.	0,110	0,080	0,030	0,93	2,024	0,789	0,105	0,684	86,7	Légère défécation, départ de fermentation en 24 heures.
Egyptia	Calvados.	0,028	0,019	0,009	0,28	1,760	1,320	0,140	1,180	89,3	Défécation par le bas.
Fertile	Ille-et-Vilaine.	0,060	0,008	0,052	1,62	0,492	0,263	0,034	0,229	86,6	Défécation par le haut en 48 heures.
Fréquin Rouge Petit	Côtes-du-Nord.	0,100	0,075	0,025	0,78	1,936	1,296	0,194	1,102	85,0	Défécation par le bas.
Grise Dieppois	Seine-Inférieure.	0,470	0,185	0,285	8,90	3,160	2,215	0,315	1,900	85,7	Pris en masse en 48 heures, forte défécation.
Groin d'Ane	Calvados.	0,030	0,008	0,022	0,68	0,132	0,075	0,018	0,057	76,0	Déféqué par le bas.
Jaune de Vitré	Mayenne.	0,034	0,017	0,017	0,53	2,380	1,580	0,212	1,368	86,6	Déféqué par le bas.
Joly Rouge Calvados	Calvados.	0,052	0,044	0,008	0,25	0,170	0,113	0,018	0,095	84,0	Déféqué par le bas en 8 jours.
Joly Rouge Beuzeville	Eure.	0,032	0,023	0,009	0,28	0,150	0,094	0,018	0,076	80,8	Bonne défécation par le bas en 8 jours.
Latour	Calvados.	0,060	0,049	0,011	0,34	1,292	0,694	0,105	0,589	84,9	Défécation légère après 3 jours.
Lemarié	Eure.	0,094	0,041	0,053	1,65	0,160	0,113	0,018	0,095	84,0	Défécation légère par le bas en 8 jours.
De Moi	Morbihan.	0,108	0,050	0,058	1,81	1,460	0,903	0,105	0,798	88,3	
Moulin à Vent	Calvados.	0,030	0,013	0,017	0,53	1,412	1,052	0,140	0,912	86,7	Forte défécation par le bas.
Noël des Champs	Calvados.	0,240	0,025	0,215	6,72	1,220	0,905	0,088	0,817	90,2	Défécation par le bas.
Penn Chopine	Morbihan.	0,204	0,127	0,077	2,40	1,768	0,976	0,140	0,836	85,6	Forte défécation en 24 heures.
Petit Doux	Ille-et-Vilaine.	0,076	0,050	0,026	0,81	1,552	1,110	0,122	0,988	89,0	Forte défécation, chapeau monté en 20 jours.
Petite Amère de Bray	Seine-Inférieure.	0,188	0,145	0,043	1,34	1,952	1,090	0,140	0,950	87,0	Forte défécation par le bas.
Petit Fréquin	Seine-Inférieure.	0,037	0,019	0,018	0,56	0,816	0,523	0,105	0,418	79,9	Forte défécation en 8 jours, chapeau bien monté.
Petit Gilet Rouge de Janzé	Ille-et-Vilaine.	0,116	0,044	0,072	2,25	1,520	0,865	0,105	0,760	87,8	Défécation légère par le bas en 7 jours, pomme aigre.
Petit Rouget (Petit Dinan)	Côtes-du-Nord.	0,040	0,022	0,018	0,56	0,832	0,520	0,140	0,380	72,9	Bonne défécation par le bas.
Pontcadeuc	Côtes-du-Nord.	0,048	0,027	0,021	0,66	1,208	0,648	0,078	0,570	87,9	Défécation légère en 6 jours.
Portier	Morbihan.	0,036	0,017	0,019	0,59	1,140	1,128	0,140	0,988	87,5	Légère défécation par le bas, pomme aigre.
Prat Yeot	Finistère.	0,092	0,044	0,048	1,50	1,248	0,789	0,105	0,684	86,7	Forte défécation, chapeau tassé en 10 jours.
Reine des Hâtives	Eure.	0,088	0,044	0,044	1,37	1,608	1,187	0,123	1,064	89,6	Pris en masse en 4 jours.
Rossignol	Seine-Inférieure.	0,132	0,092	0,040	1,25	0,424	0,356	0,052	0,304	85,4	Chapeau léger après 3 jours.
Rouge Bruyère	Seine-Inférieure.	0,084	0,056	0,028	0,87	1,208	0,667	0,211	0,456	68,3	Bonne défécation en 5 jours, chapeau bien monté.
Solage à Gouet	Calvados.	0,030	0,013	0,017	0,53	2,576	1,880	0,246	1,634	86,9	Défécation par le bas.
Stang Ru	Finistère.	0,034	0,014	0,020	0,62	0,640	0,412	0,070	0,342	83,0	Défécation par le bas.
Tesnières	Ille-et-Vilaine.	0,110	0,055	0,055	1,72	1,692	1,091	0,141	0,950	87,0	Bonne défécation par le bas en 8 jours.

Tableau V

Pomme « Amère de Berthecourt »

	Date des analyses					
	17 sept.	2 octobre	17 octobre	10 nov.	14 janv.	14 janv. fruits blonds
Pectase dans la pulpe en unités P. M.	2,12	0,31	1,0	0,62	0,57	8,18
Pectase dans le jus	0	0	0	0,06	0,09	1,91
Acide pectique libre	pas de précipité à l'alcool	indosable précipité léger et floconneux	indosable précipité trop faible	0,053	0,246	0,246
Acide pectique estérifié				0,456	1,444	0,646
Pectine pure				0,509	1,690	0,892
Indice d'estérification				89,5	85,4	72,4

Tableau VI

Pomme « Binet violet »

	Date des analyses					
	17 sept.	2 octobre	17 octobre	17 nov.	23 déc.	24 déc. fruits blonds
Pectase dans la pulpe en unités P. M.	0,20	2,59	2,37	3,17	6,58	19,12
Pectase dans le jus en unités P. M.	0	0	0,25	0	0,09	8,28
Acide pectique libre	pas de précipité à l'alcool	précipité faible floconneux (pas de pectine)	précipité faible floconneux (pas de pectine)	0,229	0,704	1,267
Acide pectique estérifié				1,216	3,230	1,140
Pectine pure				1,445	3,934	2,407
Indice d'estérification				84,1	82,1	47,4

Tableau VII

Poire « Graneville »

	Date des analyses					
	25 sept.	6 octobre	16 octobre	5 nov.	27 nov. fruits mûrs	27 nov. fruits blets
Pectase dans la pulpe en unités P. M.	1,22	3,43	0,80	1,16	2,00	4,75
Pectase dans le jus en unités P. M.	0,84	0,19	0	0	0	4,60
Acide pectique libre	pas de précipité à l'alcool	pas de précipité à l'alcool	pas de précipité à l'alcool	pas de précipité à l'alcool	léger précipité à l'alcool (indosable)	0,387
Acide pectique estérifié						0,684
Pectine pure						1,071
Indice d'estérification						63,8 %

TABLEAU VIII

Poire « Petit Roux »

	Date des analyses				
	25 sept.	6 octobre	16 octobre	5 novembre	26 novembre fruits blets
Pectase dans la pulpe en unités P. M.	1,06	1,31	1,00	0,94	2,28
Pectase dans le jus en unités P. M.	0,06	0,09	0	0	1,00
Acide pectique libre	pas de précipité à l'alcool	pas de précipité à l'alcool	pas de précipité à l'alcool	très léger précipité à l'alcool	0,317
Acide pectique estérifié					0,855
Pectine pure					1,172
Indice d'estérification				indosable	72,9 %

On constate que ces échantillons montrent, avant maturité, une certaine teneur en pectase dans leur pulpe — fait encore inexpliqué, qu'ensuite cette teneur en pectase décroît pour ne reparaître en quantité notable qu'à la maturité complète des fruits — On peut noter également, et ceci est très net, que les fruits ayant dépassé leur maturité : pommes blondes, et poires blettes, sont beaucoup plus riches en pectase que les fruits mûrs.

On remarque également que les jus sont toujours moins riches en pectase que la pulpe et que la diastase ne passe en quantité notable dans le jus que lorsque le fruit a atteint sa pleine maturité. Là aussi, on constate que les jus de fruits ayant dépassé la maturité sont beaucoup plus riches en diastase que les jus des fruits sains. Il existe un certain parallélisme entre la teneur du jus en pectase et sa richesse en pectine. Ces deux constituants suivent des courbes assez comparables, parallèles. C'est peut-être encore plus frappant pour les poires où la présence de pectine n'apparaît dans le jus, qu'au moment où l'on constate la présence de la pectase et ceci seulement dans les fruits blets. On peut donc conclure que pour les poires, la pectine n'est vraiment décelable dans les jus que par brassage de fruits blets.

Dans les pommes, le phénomène paraît plus complexe. La pectase n'apparaît dans le jus qu'avec la pectine, mais cette présence est déjà constatée avant maturité complète. A ce dernier stade, la pectase n'est encore présente qu'en très faible quantité : 0,09 unités, alors que le jus montre sa plus forte teneur en pectine. Puis avec le blondissement de la pomme, la teneur en pectase s'accroît notablement dans la pulpe et dans le jus. Les fruits blonds brassés le même jour que les fruits sains présentent alors dans leur jus de pression une richesse en pectase 20 fois plus élevée pour Amère de Berthecourt, et 90 fois plus élevée pour Binet Violet que dans le jus de fruits sains. Par contre, simultanément à cet

enrichissement du jus en pectase, on constate une forte régression de sa teneur en pectine, qui atteint 47 p. 100 pour Amère de Berthecourt, et 39 p. 100 pour Binet Violet. Cette dégradation de la pectine est accompagnée et débute vraisemblablement par une saponification qui se traduit par la chute de l'indice d'estérification de la pectine qui tombe de 85,4 à 72,4 p. 100 pour Amère de Berthecourt, et de 82,1 à 47,4 p. 100 pour Binet Violet, l'analyse révélant une nette augmentation de l'acide pectique libre accompagnant un effondrement de l'acide pectique estérifié. Ceci se vérifie par la teneur du jus de pression en méthanol qui est respectivement de 7 mg/litre dans le jus de pommes saines, contre 61,2 mg/litre dans le jus de pommes blondes pour Amère de Berthecourt et de 17,5 mg/litre dans le jus de pommes saines, contre 240 mg/litre dans le jus de pommes blondes pour Binet Violet. Cette déméthylation s'explique évidemment par l'accroissement de la teneur de la pulpe en pectase. Elle est également constatée pour les poires étudiées ici, puisque dans les fruits blets l'indice d'estérification n'est que de 63,8 et 72,9 p. 100 et que le jus de poires blettes Graneville contient 113,5 mg de méthanol par litre, celui de Petit Roux, 67 mg/litre alors que pour les fruits mûrs, mais non blets, on note respectivement 27,5 mg et 4 mg de méthanol par litre.

Ces faits laisseraient supposer que la teneur en pectase est un caractère variétal : puisqu'il existe des variétés riches en sucre, ou en acidité, en azote, en matières pectiques, il serait normal qu'il existât également des variétés plus ou moins bien pourvues en pectase. Cette notion, conjuguée avec la richesse en pectine, pourrait expliquer les variations de l'aptitude à la défécation des diverses variétés de pommes à cidre.

V. — INFLUENCE DU CUVAGE ET DU REMIAGE SUR LA TENEUR DES JUS EN P. M. ET EN MATIÈRES PECTIQUES

Cet essai a été effectué sur un lot de pommes Bédange à bonne maturité de brassage.

La totalité du lot a été râpée avec la râpe habituelle, donnant une râpure fine assez comparable à celle obtenue dans une cidrerie industrielle. Une partie de la pulpe (le 1/3 environ) fut pressé immédiatement à la petite presse à main, le jus obtenu constitue l'échantillon A, pur jus de densité 1064.

Après pressurage, le marc résiduel a été émietté et mis à macérer pendant la nuit avec moitié de son poids d'eau. Durée de la macération 16 heures, poids du marc pressé : 650 g ; poids de l'eau ajoutée : 325 g. Après macération, le pressurage du marc a donné un jus de rémiage de densité 1039,5, d'un volume de 425 cc (Echantillon B).

L'autre partie de la râpure a été abandonnée au cuvage à l'abri de

l'air à la chambre froide (T = + 10°), pendant 72 heures. Après cette durée de cuvage, la pulpe est pressée et donne un moût de densité : 1066 (Échantillon C).

Le marc pressé est émietté à son tour et remié à l'eau dans les mêmes conditions que ci-dessus : durée de la macération : 17 heures ;

poids du marc pressé : 1070 g ;

poids de l'eau ajoutée : 550 g.

Après pressurage de ce rémiage, on obtient 800 cc de jus de rémiage de densité 1039 (Échantillon D).

Le dosage de la pectase a été effectué sur la pulpe fraîche, puis sur chacun des jus obtenus : sans cuvage, après cuvage et sur les deux jus de rémiage. On a également dosé les matières pectiques sur ces quatre jus : pectine totale, acide pectique, pectine estérifiée.

Pour la pulpe fraîche, les résultats suivants ont été obtenus : par g de pulpe :

Méthanol : 124,2 γ ;

Méthanol préexistant : 28,1 γ ;

Méthanol libéré par la pectine : 96,1 γ

ce qui correspond donc à une teneur en pectase de 3 unités.

Pour les différents jus, nous avons obtenu les résultats suivants :

TABLEAU IX

En γ par cc	Densité	Méthanol total	Méthanol préexistant	Méthanol libéré par la pectase	Unités de pectase
Echantillon A....	1064	34	27	7	0,22
Echantillon B....	1039,5	34	25	9	0,28
Echantillon C....	1066	44,5	37,5	7	0,22
Echantillon D....	1039	42	28	14	0,43

D'après ces résultats, le cuvage paraît n'avoir aucune action sur la libération de la pectase par la pulpe, puisqu'après un cuvage exagéré intentionnellement (durée 3 jours), le moût de pression pur jus présente la même teneur en pectase (0,22 unités) que le jus obtenu par pressurage suivant immédiatement le râpage.

Par contre, le jus de rémiage est enrichi en pectase par rapport au pur jus, puisque dans le rémiage suivant le cuvage, la teneur en pectase est doublée par rapport au pur jus. Cet enrichissement en pectase est encore plus sensible si on rapporte la teneur en pectase à la richesse du moût en sucre. Ainsi dans les purs jus, nous avons une teneur de 0,22 unités pour 140 g de sucre, soit environ 0,15 unités pour 100 g de sucre, tandis que dans le 1° rémiage la teneur en pectase est montée à 0,34 unités pour 100 g de sucre ; dans l'échantillon D, rémiage après cuvage, nous constatons une teneur en pectase de 0,53 unités pour 100 g de sucre.

Le rémiage conduirait donc à un enrichissement du jus en pectase, cette diastase serait plus facilement libérée par les cellules après addition d'eau.

Les dosages de la pectine dans les différents jus obtenus sains ont donné des résultats encore plus intéressants, ainsi que l'indique le tableau suivant :

TABLEAU X

En g par litre	Matières pectiques	Acide pectique libre	Acide pectique estérifié	Pectine pure	Non pectine (gommes)	Indice de pureté %	Indice d'estérification %
Echantillon A	1,216	0,193	0,798	0,991	0,225	81,5	80,5
Echantillon B	2,507	0,422	1,634	2,056	0,451	82,0	79,4
Echantillon C	3,256	0,528	1,976	2,504	0,752	76,9	78,9
Echantillon D	2,227	0,387	1,520	1,907	0,320	85,6	79,7

Nous pouvons constater tout d'abord que le jus de première pression est beaucoup plus pauvre en pectine pure que les autres jus obtenus après rémiage ou macération. Cette différence de richesse est encore plus frappante si on rapporte la teneur en pectine à 100 g de sucre, on obtient alors un rapport qui passe de 0,69 pour le jus de 1° pression (A) à 2,50 pour le rémiage (B), puis à 1,79 pour le jus après cuvage (C) et enfin 2,38 pour le rémiage après cuvage (D). Le cuvage et le rémiage enrichissent donc nettement les jus en pectine puisque pour la même quantité de sucre, le jus de rémiage B est 3,6 fois plus riche en pectine que le pur jus A.

De même, après cuvage, le jus de première pression est 2,6 fois plus riche en pectine que A et enfin le jus D de rémiage suivant la macération est encore 3,4 fois plus riche en pectine que le pur jus A.

Cet enrichissement des jus en pectine tendrait donc à prouver qu'au cours du cuvage ou du rémiage, la protopectinase est active et libère une quantité de pectine non négligeable. Cette constatation peut apporter une explication scientifique plausible au fait bien connu des praticiens, que les jus de rémiage défèquent mieux que les purs jus et aussi que le cuvage favorise la défécation. Si nous nous reportons au tableau des teneurs en pectase, nous observons que la pectine soluble des jus augmente beaucoup plus par cuvage ou rémiage que leur teneur en pectase. La meilleure défécation constatée après cuvage ou rémiage s'expliquerait donc plutôt par un enrichissement du moût en pectine que par sa teneur en pectase.

Dans la défécation, le rôle de la pectase est prédominant dans la vitesse de coagulation, la teneur en pectine pure jouerait surtout sur l'importance, le volume du « chapeau brun ». Toutes choses égales d'ailleurs, on peut dire que plus le moût sera riche en pectase, plus la prise en masse sera rapide, mais plus le moût sera riche en pectine plus le coagulum sera important, plus le chapeau sera volumineux, épais, tassé. La pectase est

donc le facteur vitesse du phénomène et la pectine en est le facteur quantité. Les deux sont indispensables pour une bonne réussite de l'opération primordiale cidricole. Pour être assuré d'une bonne défécation, il faut mettre en œuvre un moût suffisamment riche à la fois en pectase et en pectine, le constituant le plus important étant en définitive la pectine, car si le moût est très pauvre en pectase (moins d'une unité) mais renferme suffisamment de pectine (> 1 g par litre) la défécation sera longue à se déclencher, mais elle arrivera à s'effectuer.

Ainsi, parmi les 4 jus ci-dessus, les 3 jus B, C, D, parmi lesquels B et C ne sont pas pratiquement plus riches en pectase que A, ont bien déféqué, tandis que pour A, il y a eu départ de fermentation avant défécation.

VI. — ÉTUDE DE QUELQUES PRÉPARATIONS DIASTASIQUES COMMERCIALES

La firme ROHM et HAAS de Philadelphie qui fabrique des préparations enzymatiques dans le but de faciliter les filtrations par dégradation de la pectine nous ayant livré des échantillons de ses produits, nous avons effectué quelques essais avec les suivants :

Pectinol A ;

Pectinol M ;

Pectine-estérase n° 4 et n° 5.

Les « pectinol » A et M sont des préparations diastasiques d'origine fongique renfermant principalement de la pectine-polygalacturonase qui agit par hydrolyse des liaisons glycosidiques 1-4 des acides polygalacturoniques. Elle scinde donc les macromolécules des chaînes de pectine en éléments plus courts. Elle diminue ainsi grandement la viscosité du jus traité en y conservant la pectine à l'état soluble. Mais en plus de la pectine-polygalacturonase, ces préparations renferment également de la pectine-méthylestérase.

Ces deux préparations commerciales ont toutes deux comme support du dextrose : elles offrent donc l'avantage d'être entièrement solubles. Elles présentent la même activité diastasique : leur différence réside en ce que le « pectinol A » renferme en plus de la gélatine, qui agit donc comme « colle ».

D'après les fournisseurs, Pectinol A est recommandé pour la fabrication du jus de pommes et de concentrés de jus de pommes. Pectinol M est recommandé pour les vins et vins de fruits.

La pectine-estérase n° 4 et n° 5, elle aussi d'origine fongique, a été l'objet de nombreux travaux du Professeur WILLAMAN et de ses collaborateurs (8-15). D'après la firme Rohm et Haas c'est une diastase concentrée qui gélifie 100 fois son poids de pectine en deux heures en présence

de $CaCl_2$. A pH 4,5 et 40°, elle provoque en 4 heures environ 12 p. 100 de déméthylation sur 85 à 100 fois son poids de pectine. Dans ces mêmes conditions, la déméthylation atteint 27 à 30 p. 100 en 16 heures. Cette enzyme est détruite par chauffage à 75°.

ACTION SUR SOLUTION DE PECTINE

Nous avons fait agir ces préparations sur 50 cc de la solution de pectine à 5 p. 1000 tamponnée à divers pH et pendant des temps variables à des températures différentes.

a) Sur solution de pectine à 5 p. 1000 tamponnée à pH 6,5 .

Après contact à 18°C pendant 1 heure de différentes quantités des préparations enzymatiques, on a obtenu les résultats suivants :

TABLEAU XI

Préparation enzymatique	Quantité de la préparation enzymatique en expérience	Méthanol libéré après 1 heure de contact	Activité diastasique mesurée par le Méthanol libéré par 1 g de préparation en 1 heure de contact à 18°, pH 6,5
Pectinol A.....	2,5 g	2,75 mg	1,1
Pectinol M.....	2,5 g	2,75 mg	1,1
Pectinel-estérase 4....	10 mg	0,45 mg	45

Dans ces conditions d'expérience, l'activité estérasique de la pectine-estérase n° 4 est environ 40 fois plus grande que celle des deux Pectinol.

La durée d'une défécation naturelle étant en cidrerie industrielle d'au moins 48 heures, nous avons prolongé l'action de ces différents produits pendant 48 heures, sur la même solution de pectine à 5 p. 1000 tamponnée à pH 6,5. Nous avons donc additionné trois prises de 50 cc de la solution pectinée, de 1 g de chacune des préparations en expérience et les avons abandonnées pendant 48 heures à la température du laboratoire. Puis le méthanol libéré a été dosé dans chaque échantillon après distillation à pH 3,0 suivant le mode opératoire habituel.

Nous avons alors obtenu les résultats suivants qui sont très voisins et comparables : 1 g de chacune des préparations expérimentées a libéré les quantités suivantes de méthanol en 48 heures :

Pectinol A.....	12,40 mg
Pectinol M.....	13,00 mg
Pectine estérase n° 4.....	12,85 mg

Ces résultats paraissent être à première vue, en contradiction flagrante avec les précédents. En effet, dans l'expérience précédente limitée à 1 heure, l'activité diastasique de la pectine-estérase n° 4 se révélait sensiblement 40 fois plus élevée que celle des deux Pectinol.

Par contre, dans notre dernier essai, les résultats sont du même ordre, les quantités de méthanol libéré dans les trois cas étant comparables. Mais dans cette dernière expérience, la durée d'action de la diastase a été portée à 48 heures. L'intérêt de cet essai réside dans le fait qu'il attire notre attention sur l'importance du facteur temps. Si on compare les résultats de ces deux derniers essais, on peut énoncer que le premier fait ressortir l'activité diastasique, le facteur vitesse de saponification, qui différencie très nettement la pectine-estérase n° 4 des deux Pectinol. Lorsqu'on veut mesurer l'activité diastasique d'une pectine-méthylestérase, il est donc nécessaire de la faire agir pendant un temps relativement court, au maximum une heure, d'ailleurs plusieurs auteurs mesurent l'activité estérasique après 1/2 heure. Dans le deuxième essai, on s'aperçoit qu'après une durée d'action assez prolongée, les doses de méthanol libéré par les différentes préparations se rejoignent et qu'ainsi après 48 heures, il n'y a pratiquement plus de différence entre celles-ci. L'action de la pectine-méthylestérase des diverses préparations aboutit au même degré de saponification de la pectine. Dans le cas considéré, la pectine utilisée libérait par saponification alcaline 90 mg de méthanol par g. Après 48 heures, les diverses enzymes ont libéré de 12,5 à 13 mg de méthanol sur les 22,5 mg existant. L'action de la P. M. s'est donc arrêtée après saponification d'environ 55 p. 100 de la pectine, ce qui correspond bien aux conditions d'emploi données par la firme Rohm et Haas qui mentionne que la déméthylation de la pectine peut être portée jusqu'à 60 à 70 p. 100.

b) Sur solution de pectine à 5 p. 1000 tamponnée à pH 4,3.

Mais ces préparations étant d'origine fongique ont leur optimum d'activité vers pH 4,5. Nous avons testé l'activité des deux lots de pectine-estérase à pH 4,3 dans une première expérience ; après contact à 35° pendant 4 heures. Nous avons alors constaté que, dans ces conditions :

10 mg de pectine-estérase n° 4 libèrent 4,25 mg de méthanol, donc 1 g pourrait libérer 425 mg de méthanol en 4 heures et 106 mg de méthanol en 1 heure,

10 mg de pectine-estérase n° 5 libèrent 4,20 mg de méthanol, donc 1 g pourrait libérer 420 mg de méthanol en 4 heures et 105 mg de méthanol en 1 heure.

Nous avons ensuite expérimenté ces deux échantillons toujours à pH 4,3 mais à 10° et pendant 24 heures.

Dans ces conditions,

10 mg de pectine-estérase n° 4 libèrent 2,25 mg de méthanol, 1 g pourrait donc libérer 225 mg de méthanol en 24 heures et 9,4 mg environ en 1 heure,

10 mg de pectine-estérase n° 5 libèrent également 2,25 mg de méthanol.

Donc, les deux préparations de pectine-estérase sont bien comparables. Ces divers essais mettent bien en évidence, d'une part l'influence de la température, d'autre part l'influence du pH sur l'activité estérasique, puisque dans le premier cas, à pH 6,5 et à 18°, 1 g de pectine-estérase libère 45 mg de méthanol en 1 heure, alors qu'à pH 4,3 et à 35°, 1 g de cette même diastase est susceptible de libérer 105 mg de méthanol.

ACTION SUR DES MOUTS DE POMMES A CIDRE

A la sortie du pressoir, on ajoute à quelques jus de pommes à cidre en plus de 2 cc de solution de $CaCl_2$, ce qui correspond à 150 mg de CaO par litre, des doses de 1 g de Pectine-estérase, ou 2 g de Pectinol A, ou 2 g de Pectinol M par litre, dans le but d'étudier l'influence de ces préparations sur la défécation et sur l'enrichissement en méthanol qu'elles peuvent provoquer dans le cidre. Le tableau suivant donne les résultats obtenus : aspect du liquide et quantité de méthanol libéré après 24 heures de contact, et par comparaison, la quantité de méthanol libéré à la défécation en bonbonnes n'ayant reçu que du chlorure de calcium. Les échantillons traités aux enzymes étaient conservés à la chambre froide à 10° et les bonbonnes de fermentation à la cave à une température sensiblement identique.

Tableau XII

Variétés étudiées	Méthanol en mg par litre					
	dans le jus à l'origine	après 24 h de contact avec, au litre				Après défécation en bonbonnes, au soutirage
		2 cc $CaCl_2$	2 cc $CaCl_2$ + 1 g Pectase n° 4	2 cc $CaCl_2$ + 2g Pectinol A	2 cc $CaCl_2$ 2 g Pectinol M	
Pontcadeuc .	27	53 pas de défécation	80 pris en masse après 15 heures de contact	71 léger coagulum en 24 heures	74 léger coagulum en 24 heures	96 déféqué en 6 jours chapeau léger
Penn Chopine	127	176 pris en masse en 24 heures	211 pris en masse en 24 heures	—	—	198 forte défécation en 24 heures
Doux Normand .	80	93 pris en masse en 15 heures	140 pris en masse en 15 heures	117 après 15 heures coagulum double des précédents	—	180 déféqué en 24 heures
Douce Glaz..	143	195 pas de défécation en 24 heures	221 coagulum léger en 24 heures	224 coagulum épais et volumineux	—	288 forte défécation en 48 heures

Dans une autre série d'essais, nous avons également étudié l'activité de la pectine-estérase, toujours en présence de 2 cc de solution de $CaCl_2$ au litre. Nous n'avons pas dosé le méthanol formé après 24 heures de contact mais nous nous sommes contenté de le doser après fermentation, lorsque le cidre s'est stabilisé, soit entièrement désucré, soit naturellement doux. Nous avons obtenu les résultats suivants :

1° **Avec la variété Blanc Mollet** : les échantillons ont été analysés le 14 avril 1953, soit après une fermentation de six mois.

Densité à l'origine : 1055 le 22 octobre.

Méthanol dans le jus sortant du pressoir : 45 mg par litre.

a) Échantillon additionné de 2 cc de $CaCl_2$ au litre.

Densité : 1014,

Alcool acquis : 5°4,

Méthanol : 130 mg par litre.

En bonbonnes, on a obtenu : 142 mg de Méthanol au soutirage, après défécation.

b) Échantillon additionné de 2 cc $CaCl_2$ + 100 mg Pectase n° 4 au litre .

Densité : 1016,

Alcool acquis : 5°2,

Méthanol : 131 mg par litre.

c) Échantillon additionné de 2 cc $CaCl_2$ + 100 mg Pectase n° 5 au litre :

Densité : 1012,

Alcool acquis : 5°6,

Méthanol 129 mg par litre.

d) Un échantillon de pommes blondes brassées séparément, a été additionné de 2 cc de $CaCl_2$ au litre. La défécation est immédiate, mais on n'observe pas une prise en masse, seulement un précipité floconneux.

Après 24 heures, le jus accuse une teneur de 360 mg de méthanol au litre, le 14 avril, l'analyse donne :

Densité : 1032,

Alcool acquis : 3°95,

Méthanol : 321 mg par litre.

2° **Avec la variété Reine des Hâtives** :

Densité à l'origine : 1047,7,

Méthanol dans le jus sortant de pressoir : 44 mg par litre,

Après 6 mois l'analyse donne :

a) Échantillon additionné de 2 cc $CaCl_2$ par litre :

Densité : 1005,

Alcool acquis : 5°6,

Méthanol : 171 mg par litre.

En bonbonnes on a obtenu 184 mg par litre de Méthanol au soutirage après défécation.

b) Échantillon additionné de 2 cc $CaCl_2$ + 50 mg Pectase n° 4 par litre :

Densité : 1000,
Alcool acquis : 6°2,
Méthanol : 166 mg par litre.

3° **Avec la variété Rossignol** :

Densité à l'origine : 1049,
Méthanol dans le jus sortant du pressoir : 92 mg par litre.
Après 6 mois l'analyse donne :

a) Échantillon ayant reçu 2 cc $CaCl_2$ au litre :

Densité : 1001,
Alcool acquis : 6°1,
Méthanol 121 mg par litre.

En bonbonnes, on a obtenu : 123 mg par litre de Méthanol au soutirage après défécation.

b) Échantillon ayant reçu 2 cc $CaCl_2$ + 100 mg Pectase n° 4 au litre :

Densité : 1001,
Alcool acquis : 6°0,
Méthanol : 121 mg par litre.

La conclusion la plus importante qui se dégage de ces deux séries d'essais est que le jus de pommes renferme suffisamment de pectase naturelle active pour saponifier la pectine et libérer le méthanol puisque par addition de préparations enzymatiques plus ou moins riches en pectine-méthylestérase, on n'obtient pas, par rapport aux témoins, une augmentation notable de la teneur en méthanol, après un temps d'action assez long. Il faut toutefois reconnaître, ainsi qu'il ressort du tableau XII, que l'addition de pectine-méthylestérase provoque une saponification plus rapide de la pectine puisque dans tous les échantillons ayant reçu soit de la pectine-estérase n° 4, soit l'un ou l'autre Pectinol, on constate toujours une teneur en méthanol plus élevée en 24 heures que dans le témoin n'ayant reçu que du $CaCl_2$. Par contre, les teneurs observées en bonbonnes, mais après un laps de temps plus étendu, sont ou égales, ou plus généralement supérieures à celles libérées en 24 heures par la pectase ajoutée. La deuxième série d'essais confirme bien qu'après une longue action et après fermentation, les teneurs en méthanol sont tout à fait semblables, qu'on ait ajouté ou non une pectine-estérase fongique commerciale.

VII. — PECTINE-MÉTHYLESTÉRASE, PECTINE ET MÉTHANOL

La deuxième constatation que ces essais nous amènent à faire, et que l'on pourrait présenter comme corollaire de la conclusion précédente, c'est que la teneur d'un cidre en méthanol n'est pas en relation avec sa richesse en pectase naturelle, ou accrue artificiellement, mais est sous l'étroite dépendance de sa teneur en pectine. Il existe une certaine proportionnalité entre pectine et méthanol. Le tableau XIII suivant rassemble les échantillons étudiés précédemment au point de vue de leur teneur en pectine à la sortie du pressoir, et des doses de méthanol trouvées à la sortie du pressoir et au soutirage après action de la P. M. naturelle du fruit.

Tableau XIII

Variétés	Méthanol en mg par litre				
	au soutirage après défécation	à la sortie du pressoir	libéré par la P.M. au cours de la défécation	Pectine pure en g par litre à la sortie de presse	Méthanol libéré par g de pectine (en mg)
Pontcadeuc.....	96	27	69	0,648	106
Penn Chopine....	198	127	71	0,976	73
Doux Normand...	180	98	82	0,789	104
Douce Glaz.....	288	170	118	1,800	65
Blanc Mollet.....	142	45	97	0,790	122
Reine des Hâtives.	184	44	140	1,187	118
Rossignol	123	92	31	0,356	87

Cette proportionnalité n'est évidemment pas rigoureuse, et ne peut être chiffrée par un rapport constant. En effet, on évalue ici un phénomène in vivo qui est fonction de plusieurs facteurs, qui ne sont identiques dans aucun des cas étudiés.

Tout d'abord le matériau en évolution, la pectine qui est à un taux d'estérification moyen voisin de 85 p. 100 dans le jus de pommes, présente cependant des variations d'un échantillon à l'autre, ces divergences reflétant d'ailleurs plutôt une différence de maturation du fruit qu'un caractère variétal. Ainsi dans le tableau IV portant sur les analyses de 45 jus de pommes sortant du pressoir, l'indice d'estérification varie de 68 à 89 p. 100.

De plus, la teneur en pectine-méthylestérase est variable d'un échantillon à l'autre, suivant la variété et aussi la maturité ; le temps écoulé entre l'élaboration du jus et le soutirage après défécation — moment où a été effectué le dosage du méthanol — est également différent ; enfin la réaction pH du milieu varie suivant les jus et dans les cas qui nous intéressent, de pH 3,40 pour Penn Chopine à 4,15 pour Doux

Normand. Ces différents facteurs : teneur en P. M., durée de l'action diastasique, et pH conditionnent l'activité de la pectine-estérase et par conséquent le degré de saponification de la pectine. Il en résulte qu'au soutirage, la pectine à haut degré d'estérification présente dans les jus, à la sortie de la presse, a été plus ou moins déméthylée, ce qui est exprimé par les rendements différents en méthanol mentionnés dans la dernière colonne du tableau ci-dessus. Ils indiquent nettement par exemple que la pectine du jus de variété Douce Glaz a été bien moins déméthylée que celle de Blanc Mollet, pour ne citer que les deux extrêmes. Notons, pour donner un ordre d'idées, que 1 g de pectine pure supposée estérifiée à 100 p. 100 libérerait par saponification totale 168 mg de méthanol pur ; pour une pectine estérifiée à 85 p. 100, indice d'estérification moyen de la pectine de pomme, 1 g libérerait 143 mg de méthanol. On peut donc constater d'après le tableau précédent, qu'après défécation la pectine est assez fortement déméthylée, puisque pour quatre échantillons, le rendement en méthanol est supérieur à 100 mg par g de pectine, l'indice d'estérification est tombé d'une moyenne de 85 p. 100 à 30 p. 100 environ.

VIII. — INFLUENCE DU BLETTISSEMENT DES FRUITS SUR LA TENEUR EN MÉTHANOL

Cette très importante déméthylation diastasique du jus de pommes au cours de la défécation, explique la teneur relativement élevée des cidres en méthanol. Celle-ci est évidemment sous la dépendance de la teneur du moût en pectine, d'où les variations assez importantes que l'on a pu constater dans la richesse des cidres en méthanol. Mais comme nous l'avons vu précédemment, la teneur en pectine est au moins pour autant un test de la maturité du fruit qu'un caractère strictement variétal. Avant leur maturité, on peut dire que pommes à cidre ou de table, comme poires à poiré, tous fruits pourtant bien différenciés dans leurs caractères tant botaniques que gustatifs, présentent un caractère analytique identique : absence de pectine soluble dans leur tissu, d'où par pression obtention d'un jus exempt de pectine. Tandis qu'à la maturité les jus de tous ces fruits présentent de la pectine soluble, en teneur évidemment variable, et après action suffisamment prolongée de la pectine-méthylestérase, tous ces jus renferment du méthanol en quantité d'autant plus élevée que les fruits étaient plus mûrs et plus riches en pectine. Cette constatation est encore plus frappante pour les poires à poiré que pour les pommes. En effet les poires passent très vite du stade maturité au blettissement et la teneur en méthanol passe très rapidement d'une valeur voisine de 0 à des chiffres très élevés. Pour d'autres recherches

se rapportant aux matières tannoïdes, nous avons brassé la collection de poires à poiré du verger de l'E. N. A. R. avant leur complète maturité et nous avions été surpris de constater dans tous les échantillons l'absence totale de méthanol. Nous avons alors répété le dosage en ne brassant que des fruits tombés naturellement de l'arbre, ayant atteint sensiblement leur maturité de brassage et même dépassé celle-ci pour certaines variétés, les fruits étant déjà blets. Nous avons alors obtenu après fermentation des poirés dont le tableau suivant donne la composition en éthanol et en méthanol.

TABLEAU XIV

Analyse de poirés 1952-53.

Variétés	Densité	Ethanol % en volume	Méthanol mg/litre	Méthanol en mg pour 100 g d'éthanol
Gros Blot	1 040	2°9	26	112
Chenevières (blettes)	1 011,5	7°4	691	1 167
Coignet (blettes)	1 011	5°6	180	401
Deniacre	1 010	5°8	110	237
Graneville (blettes)	1 005	6°7	211	393
Mathéaux	1 041,5	4°3	56	163
Muscadet (blettes)	1 004	6°7	134	250
Navet	1 013	6°4	44	86
Negel (blettes)	1 001,5	7°6	230	378
Plant de Blanc	1 007,5	7°2	13	22
Petit Roux	1 034,5	2°7	213	986
Rouge Vigny	1 008,5	7°4	226	382
Rousset (blettes)	1 013,5	6°6	493	933
Souris	1 015	5°9	6	12

Les poirés peuvent donc présenter des différences très importantes pouvant aller de 0 à environ 700 mg de méthanol par litre suivant l'état de maturité des fruits entrant en fabrication. Avec les fruits blets, on atteint des teneurs que nous n'avions encore jamais observées pour les pommes. Cependant les pommes blondes donnent elles aussi des jus plus riches en méthanol que les pommes mûres mais encore saines.

Ainsi un lot de pommes « Blanc Mollet » a été brassé lorsque les fruits ont atteint le « blondissement » ce qui correspond pour les pommes à cidre au stade blettissement des poires.

Le jus de pression a été additionné de chlorure de calcium à la dose habituelle et a déféqué immédiatement en donnant un précipité floconneux. Après 24 heures, le dosage du méthanol a révélé la teneur élevée de 360 mg par litre, alors que les fruits à maturité normale donnent après défécation, une teneur de 142 mg par litre (tableau XV). Par le blettissement, la teneur du jus en méthanol a donc été plus que doublée, et on peut supposer que dans le cas de variétés riches en matières pectiques, les variations des teneurs en méthanol révéleront encore plus

d'amplitude selon que les fruits sont mûrs à point ou au stade « pommes blondes ».

La conclusion que l'on peut tirer de ces constatations est que plus les fruits seront mûrs, plus leurs jus seront riches en méthanol. Et par voie de conséquence, si l'on veut obtenir une boisson exceptionnellement pauvre en méthanol, il suffira de brasser les fruits avant leur complète maturité de brassage.

IX. — INTERPRÉTATION TECHNOLOGIQUE

Du point de vue technologique, il est intéressant de constater l'importance de la maturité du fruit sur sa teneur à la fois en pectine et en pectine-méthylestérase. Si l'industriel cidricole veut axer sa fabrication sur l'obtention de cidres naturellement doux, nous avions déjà indiqué précédemment (16) qu'il lui était nécessaire de brasser des fruits à bonne maturité afin que les jus de pression soient appauvris le plus possible en azote : ainsi après défécation, la levure n'ayant à sa disposition qu'un milieu carencé en azote, la fermentation s'arrête avant consommation totale des sucres. Or ces derniers travaux nous ont montré que la défécation ne peut réussir que si l'on brasse des fruits renfermant de la pectine soluble en quantité suffisante, et également de la pectine-méthylestérase qui par déméthylation provoquera la coagulation de la pectine, donc la formation d'un « chapeau brun ».

Ces deux nouvelles conditions ne sont remplies que si la pomme a atteint un degré de maturité suffisant. Ces dernières constatations ne peuvent qu'accentuer l'importance de la maturité du fruit sur la bonne marche de la fabrication du cidre, ainsi que sur les qualités gustatives du produit fini : cidre ou eau-de-vie, qui sont conditionnées par l'allure de la fermentation. Des fruits de maturité insuffisante donnent un jus riche en azote, dépourvu de pectine, qui ne déféquera pas et fermentera rapidement, ayant conservé la totalité de son azote, en donnant une boisson de médiocre qualité et de mauvaise conservation ; par contre, en brassant des pommes à bonne maturité, on obtiendra un jus riche en pectine et en pectine-méthylestérase, appauvri en azote qui, après défécation, sera encore plus carencé en ce dernier élément, dont la fermentation sera lente, et incomplète, si les variétés brassées s'y prêtent. Le cidre sera toujours un produit aux qualités gustatives marquées et très appréciées et de bonne conservation, dont la distillation produira une eau-de-vie bouquetée et de qualité.

La concentration en P. M. agit principalement sur la vitesse de coagulation de la pectine, donc sur la rapidité de la défécation plutôt que sur l'amplitude de celle-ci. En général, c'est la richesse du jus en pectine qui influe surtout sur l'importance de la défécation, le volume du cha-

peau. Le tableau IV montre que généralement les jus riches en P. M. défèquent plus vite, mais que les jus faiblement pourvus en P. M. présentent eux aussi des défécations bien marquées, volumineuses lorsqu'ils sont suffisamment riches en pectine.

La confrontation de la richesse d'un jus en pectine-méthylestérase et en pectine avec la perte d'azote provoquée par la défécation, ne nous a pas permis de tirer de conclusions. Les observations sont assez contradictoires et ne permettent pas une interprétation rigoureuse. On pouvait être amené à penser que plus la défécation était importante, plus l'élimination d'azote produite par ce phénomène serait importante. On aurait pu alors chercher à établir une relation entre l'élimination de l'azote due à la défécation et la teneur du moût soit en pectase, soit plutôt en pectine. Mais d'après les résultats que nous possédons, les variations sont trop divergentes pour permettre d'énoncer une relation quelconque entre ces divers facteurs. Ainsi par exemple : PETIT-ROUGET qui dose 0,56 unités P. M. et 0,520 g de pectine pure par litre, subit par défécation une perte d'azote de 43,1 p. 100 — teneur passant de 40,6 à 23,1 mg par litre.

Noël des Champs titrant 6,72 unités P. M. et 0,905 g de pectine pure présente par défécation une perte d'azote de 44,2 p. 100 donc tout à fait comparable en pourcentage (tombant de 36,4 à 20,3 mg par litre) alors qu'elle est bien plus riche en pectase et en pectine pure.

Jaune de Vitré, dosant 0,53 unités P. M. mais riche en pectine pure : 1,580 g ne subit par défécation qu'une faible perte d'azote : 11,8 p. 100 (de 77 à 67,9 mg).

Groin d'Ane, pauvre en pectase : 0,68 unités P. M. et en pectine : 0,075 g subit par défécation une élimination importante d'azote : 45,3 p. 100 (teneur tombant de 52,5 à 28, 7 mg).

Nous pourrions multiplier les exemples, et il va de soi qu'avec de tels résultats nous ne pouvons prétendre établir un rapport entre ces divers éléments du jus.

Ces derniers travaux permettent par contre de montrer la relation étroite qui existe entre la teneur d'un moût en pectine à la sortie de la presse et sa teneur en méthanol après fermentation.

Le tableau XIII avait déjà montré qu'on pouvait dégager une certaine proportionnalité entre pectine du jus et méthanol du cidre.

Le tableau XV rassemble les teneurs en méthanol des cidres de la campagne 1952-53 brassés et analysés à notre Station. Il présente avec la teneur en alcool acquis, les richesses en méthanol à la sortie du pressoir, au soutirage suivant la défécation, et à la mise en bouteilles, lorsque la fermentation est pratiquement terminée. Ce tableau complète les données analytiques concernant les teneurs des cidres en méthanol déjà publiées précédemment (13-17). En rapprochant les teneurs en méthanol

TABLEAU XV

Cidres Campagne 1952-53

Variétés	Origine	Densité originelle du Moût	Densité du cidre à la mise en bouteilles	Alcool acquis à la mise en bouteilles	Méthanol en mg par litre			Méthanol en mg pour 100 g d'Éthanol
					à la sortie du pressoir	au soutirage après défécation	à la mise en bouteilles	
Fertile	Ille-et-Vilaine.	1045,0	1017,8	3°2	8	26	27	105
Groin d'Ane	Calvados.	1050,7	1024,5	3°3	8	46	49	185
Joly Rouge Beuzeville	Eure.	1051,5	1021,0	3°7	23	60	53	179
Petit Rouget	Côtes-du-Nord.	1041,2	1019,7	2°5	22	61	60	300
Stang Ru	Finistère.	1056,2	1044,7	1°3	14	67	68	653
Joly Rouge Mesnil-Durand	Calvados.	1051,5	1008,5	5°6	44	78	79	176
Variété Lemarié	Eure.	1055,0	1012,0	5°6	41	86	90	200
Pontcadeuc	Côtes-du-Nord.	1057,7	1022,0	4°5	27	96	90	250
Avalou Beleien	Finistère.	1061,3	1040,2	2°5	15	71	91	455
Cazo Gris	Morbihan.	1049,7	1015,8	4°4	67	95	100	284
Prat Yeot	Finistère.	1057,2	1031,5	3°0	44	98	102	425
Rossignol	Seine-Inférieure.	1049,0	999,5	6°5	92	123	112	215
Latour	Calvados.	1048,0	1001,0	6°0	49	94	129	264
Blanc Mollet	Ille-et-Vilaine.	1055,0	1017,8	4°7	45	142	132	351
Petit Gilet Rouge	Ille-et-Vilaine.	1061,8	1015,8	6°1	44	141	142	291
Noël des Champs	Calvados.	1050,7	1030,0	2°7	25	136	143	662
Solage à Gouet	Calvados.	1054,3	1036,7	2°1	13	220	147	878
Doux Normand	Côtes-du-Nord.	1049,5	1000,3	6°3	98	180	149	295
Petit Doux	Ille-et-Vilaine.	1052,6	1010,5	5°4	50	152	150	347
Pomme de Moi	Morbihan.	1055,8	1017,2	5°0	50	142	151	377
Moulin à Vent	Calvados.	1067,0	1049,0	2°1	13	144	153	910
Reine des Hâtives	Eure.	1047,7	1010,0	4°7	44	184	166	441
Doux Coursier	Ille-et-Vilaine.	1049,0	1000,5	6°3	121	196	169	335
Tesnières	Ille-et-Vilaine.	1067,3	1018,7	6°5	55	178	178	342
Doux Crasseux	Ille-et-Vilaine.	1060,6	1031,8	3°7	12	148	179	604
Egyptia	Calvados.	1050,7	1027,5	2°9	19	158	183	788
Variété Cadudal	Morbihan.	1061,2	1020,6	5°2	52	185	197	473
Petit Fréquin Rouge	Côtes-du-Nord.	1054,0	1031,0	2°7	75	192	205	949
Barrière	Calvados.	1045,2	1004,0	5°2	40	195	207	497
Penn Chopine	Morbihan.	1050,5	1009,5	5°3	127	198	211	497
Jaune de Vitré	Mayenne.	1069,8	1007,0	8°0	17	109	219	342
Petite Amère de Bray	Seine-Inférieure.	1054,3	1027,0	3°4	145	225	233	856
Douce Glaz	Morbihan.	1052,6	1013,5	5°0	170	288	281	702
Coquerelle	Ille-et-Vilaine.	1052,4	1029,0	2°9	162	283	302	1301
Doux Lalouet	Ille-et-Vilaine.	1050,0	1036,3	1°7	169	386	320	2353
Doux Amer Gris	Ille-et-Vilaine.	1056,5	1017,7	5°1	201	403	394	965
Grise Dieppois	Seine-Inférieure.	1078,5	1046,0	4°4	185	422	445	1264

des cidres de leur richesse primitive en pectine (tableau IV), on constate facilement que ce sont les jus les plus riches en pectine qui conduisent aux cidres les plus riches en méthanol. Dans nos publications précédentes, nous avions obtenu des maximums de 300 mg de méthanol par litre, alors que le tableau XV nous donne pour quelques variétés des teneurs dépassant 300 mg avec un maximum imposant de 445 mg pour la variété « Grise Dieppois ».

Ce tableau montre également que dans la plupart des cas, la presque totalité du méthanol est libérée déjà à la défécation, c'est-à-dire pratiquement avant la fermentation alcoolique ; le méthanol est bien d'origine diastasique et non fermentative. Dans le cas de cidre pauvre en azote après défécation, et restant naturellement doux à une densité élevée, on obtient des doses en méthanol rapportées à 100 d'éthanol très élevées : 1264, 1301 et même 2353 mg de méthanol pour 100 g d'éthanol pour les variétés les plus riches : Grise Dieppois, Coquerelle et Doux Lalouet ; alors que ce même rapport s'établit entre 40 et 240 pour les vins français. Pour les poirés (tableau XIV), ce rapport subit également de grandes variations de 12 pour la variété Souris à 1167 pour la variété Chenevières brassée après blettissement et exceptionnellement riche en méthanol (691 mg) du fait de cette surmaturation des fruits qui s'est traduite par une hydrolyse importante de la protopectine, d'où un enrichissement exceptionnel du jus en pectine.

L'utilisation des préparations enzymatiques dépectinisantes restera très limitée d'emploi en Cidrerie française, car la fabrication est basée presque exclusivement sur la réalisation d'une bonne défécation. Ces produits ne sont pas purs et renferment en plus de la pectine-glycosidase des quantités plus ou moins importantes de pectine-méthylestérase, ainsi que d'autres enzymes sécrétées également par les moisissures : amylase, cellulase, etc... Leur utilisation est plus intéressante dans la fabrication des jus de fruits et dans l'industrie des concentrés où il s'agit de solubiliser la pectine pour éviter des prises en gelées ultérieures, qu'en cidrerie où le problème primordial consiste non à solubiliser la pectine, mais à la coaguler avec une partie importante des matières azotées.

X. — CONCLUSIONS GÉNÉRALES

Par ce travail, nous avons voulu, tout d'abord, montrer que la mesure de l'activité de la Pectine-Méthylestérase naturelle de la pomme était possible, et même assez facilement réalisable, à condition de l'effectuer d'après une méthode sensible de dosage du méthanol. Cette technique présente d'ailleurs l'avantage d'être basée sur la propriété la plus spécifique de cette diastase : la déméthylation de la pectine. Le micro-

dosage colorimétrique du méthanol, étant très sensible, permet d'évaluer de très faibles quantités de P. M., donc de la doser dans les milieux naturels où elle est présente à de faibles concentrations, et où la méthode alcalimétrique ne donne que des résultats négatifs ou incertains. Cette dernière méthode sera donc réservée à l'étude des produits enzymatiques industriels concentrés tels que les nombreux adjuvants de filtration que l'on trouve actuellement dans le commerce. Mais dans un milieu naturel fortement tamponné et faiblement pourvu en enzyme, tel que le jus de pommes, cette méthode de dosage alcalimétrique sera très aléatoire, même avec un potentiomètre perfectionné, ce qui explique sans doute pourquoi différents auteurs n'ont pu déceler la P. M. dans les tissus de la pomme.

D'après nos recherches la teneur des pommes et des poires en P. M. peut varier dans des limites assez étendues, puisqu'elle varie dans les cas étudiés de 0,44 à 11,90 pour la pulpe des pommes de table, de 1,31 à 1,51 dans leur jus de pression ; pour les moûts de pommes à cidre, nous avons trouvé des teneurs de 0,06 à 8,90 ; pour les poires à poiré, de 0,87 à 21,8 dans la pulpe, de 0,03 à 16,75 dans le jus. En règle générale la richesse de ces fruits en pectine-méthylestérase est beaucoup plus une question de maturité qu'un caractère variétal. Plus le fruit est mûr, plus il est riche en P. M. ; les fruits blets étant les mieux pourvus. L'enrichissement des moûts en P. M. est parallèle à leur teneur en pectine. Ces faits nous donnent un argument supplémentaire et nous permettent d'insister toujours davantage sur l'importance, qu'il convient d'accorder, en cidrerie, au brassage uniquement de fruits ayant atteint leur pleine maturité, condition essentielle de la réussite d'une bonne défécation et de la fabrication d'une boisson de qualité.

L'emploi d'enzymes de filtration ne paraît pas présenter un grand intérêt en cidrerie, la technique généralement adoptée en France étant basée sur la défécation, donc sur la coagulation des matières pectiques et non sur leur solubilisation par clivage et dégradation.

Nous donnons enfin, pour compléter la documentation déjà publiée, des tableaux des teneurs de cidres et poirés en méthanol montrant que ces boissons sont souvent plus riches que les vins en cet alcool, cette teneur en méthanol étant étroitement liée à la teneur des moûts en pectine.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

(1) Fremy (E.). — *J. Pharm. Chim.*, **26**, 292, 1840.
(2) Von Fellenberg (Th.). — *Biochem. Zeit.*, **85**, 45, 1918.
(3) Tutin (F.). — *Biochem Zeit.*, **15**, 494, 1921 ; **17**, 83, 1923.
(4) Deuel (H.). — *Experientia*, **3**, 151, 1947.
(5) Kertesz (Z. I.). — The Pectic Substances. *Interscience Publishers*, Inc. N. Y., 365, 1951.

(6) SCHUBERT (E.). — Schweizer Brauerei Rundschau, **62**, 3-4, 39-66, 1951.
(7) MEHLITZ (A.) et MAASS (H.). — *Biochem. Zeit.*, **276**, 66, 1935.
OWENS (H. S.), Mc CREADY (R. M.) et MACLAY (W. D.). — *Ind. Eng. Chem.*, **36**, 936, 1944.
KIESER (M. E.), POLLARD (A.) et STONE (A. M.). — *A. R. Agric. Hort. Res. Stat.* Bristol, 228, 1948.
POLLARD (A.) et KIESER (M. E.). — *Journ. Sc. Food. Agric.*, **1**, 30, 1951.
JOSLYN (M. A.), MIST (S.) et LAMBERT (E.). — *Food Technol.*
(8) Mac COLLOCH (R. J.) et KERTESZ (Z. I.). — Pectic Enzymes VIII, *Arch. Biochem.*, **13**, 217, 1947.
CALESNICK (E. J.), HILLS (C. H.) et WILLAMAN (J. J.). — *Arch. Biochem*, **28**, 433, 1950.
PHAFF (H. J.). — The Biochemistry of the Exocellular Pectinase of Penicillium Chrysogenum, Dissertation, Un. of California, Berkeley, 1943.
(9) KERTESZ (Z. I.). — *Food Research*, **4**, 113, 1939.
HOLDEN (M.). — *Biochem J.*, **40**, 103, 1946.
(10) Mac COLLOCH (R. J.) et KERTESZ (Z. I.). — *Arch. Biochem.*, **13**, 217, 1947.
(11) JACQUIN (P.) et TAVERNIER (J.). — *C.R. Acad. Agric.*, **39**, 592, 1953.
(12) REID (W.). — Recent Advances in Fruit Juice, Production, by Charley V.L.S. and Others. Chap. XI, p. 148.
(13) JACQUIN (P.) et TAVERNIER (J.). — Ces Annales, **2**, 113, 1953.
(14) GENEVOIS (L.) et PEYNAUD (E.). — *Rev. Hort.*, **30**, 295-317, 1947.
PEYNAUD (E.). — *Ind. Agric. Alim.*, 11-12, 609, 1951.
(15) WILLAMAN (J. J.). — *Botan. Gaz.*, **70**, 221, 1920.
(16) TAVERNIER (J.) et JACQUIN (P.). — *C. R. Acad. Agr.*, **32**, 216, 1946.
JACQUIN (P.) et TAVERNIER (J.). — *C. R. Acad. Agr.*, **37**, 93, 1951.
(17) JACQUIN (P.) et TAVERNIER (J.). — *C. R. Acad. Agr.*, **38**, 323, 1952.

LE VIN ET QUELQUES CAUSES DE SON ENRICHISSEMENT EN FER

PAR

P. DUPUY, M. NORTZ, J. PUISAIS

Laboratoire départemental de la Vienne, Poitiers.

PLAN DU MÉMOIRE

I. — Introduction.

II. — Influence de la nature du sol.

III. — Enrichissement au cours de la vinification.

a) Étude de l'enrichissement aux différents stades de la vinification dans les chais.

b) Étude comparée des lies obtenues dans les chais et au laboratoire.

IV. — Enrichissement au laboratoire.

a) Au contact du métal.

b) Au contact des terres.

V. — Conclusion.

VI. — Bibliographie.

I. — INTRODUCTION

Selon différents auteurs, les besoins de l'homme en fer peuvent aller de 12 à 30 mg par jour, nous ne saurions donc manquer de nous réjouir en constatant que parmi tant d'autres qualités le vin possède celle de nous apporter cet élément indispensable. Tout autre, est cependant le point de vue des viticulteurs, qui en voyant augmenter la teneur de leur vin en fer, voient également compromettre les qualités et la stabilité de leurs récoltes.

Dans un mémoire remarquable R. CORDONNIER (1) conclut à la double origine de cet enrichissement : biologique et extérieure. Nous avons pu constater que le jus de raisin contient du fer indépendamment

de tout apport extérieur, et il n'est pas impossible que la fertilisation favorise cette assimilation par la plante. Un apport plus important serait cependant imputable au contact du vin avec les surfaces métalliques pendant la vinification. Mais dans les cas que nous avons pu étudier cette dernière hypothèse demeure insuffisante. Nous avons en effet calculé que pour que cette hypothèse demeure acceptable, il aurait fallu que le matériel métallique et notamment les rouleaux des fouloirs, se fussent à peu près totalement dissous dans le vin préparé par les grandes installations vinicoles. Aussi, à la suite de remarques de M. Flanzy, avons-nous été amenés à considérer le rôle de la terre qui souille facilement les raisins sur des branches que nos viticulteurs laissent volontiers assez près du sol.

Nous nous sommes efforcés au cours de cette étude de suivre le raisin à partir de la vendange jusqu'à la fin de la vinification et ceci simultanément et parallèlement au laboratoire et dans les chais.

Enfin pour vérifier les hypothèses suggérées par ce contrôle, nous avons tenté de reproduire au laboratoire le phénomène de la solubilisation du fer qui, commencé dans la vigne elle-même, ne se terminera que dans les cuves.

II. — INFLUENCE DE LA NATURE DU SOL

Pour étudier l'origine biologique du fer dans le vin, nous avons recueilli les raisins dans les vignes au moment de la vendange. Pour chaque cépage une quantité de raisins variant entre 6 et 8 kg, avait été récoltée, puis vinifiée séparément au Laboratoire suivant les méthodes ordinaires ; depuis les rouleaux en aluminium de l'égrenoir jusqu'aux barils en verre où la fermentation fut conduite, le jus de raisin a été totalement préservé de tout contact avec le fer.

L'analyse des vins, en vue du dosage de cet élément a été effectuée suivant la méthode de Ferré et Michel (2) au thiocyanate, ou suivant celle de J. Ribereau-Gayon (3) qui comporte la préparation d'une gamme étalon. Dans le cas des vins rouges le thiocyanate ferrique formé, était extrait à l'éther. Dans tous les cas, les mesures étaient effectuées par comparaison au bloc de Walpole. Les deux procédés conduisent à des résultats tout à fait comparables qui sont groupés dans le tableau suivant (tableau I).

Comme il fallait s'y attendre, la teneur en fer varie suivant l'origine du vin, mais il apparaît à l'examen de ce tableau qu'il n'existe pas de relation entre le cépage et la richesse en fer. Nous nous intéressâmes tout d'abord à la teneur en fer des sols examinés. En général leur nature s'est montrée assez uniforme dans les vignobles étudiés ; il s'agissait de terres siliceuses ou argilo-siliceuses dont la teneur en fer était comprise

Cépages Rouges	Origine du terrain	Fer en mg/l	Cépages Blancs	Origine du terrain	Fer en mg/l
Rudelin 154 7	A	7	S 9 110	B	3
— 111 8	A	3	Landot 2281	B	5,5
— 227 8	A	9	Landot 2282	B	9
Landot 244	B	9	Couderc 16	B	2
Burdin 7 061	B	10	J. S. 23416	B	5
Landot 4 511	B	10	Vidal 597	V	2,5
S 13 666	B	11	Vidal 591	V	2
Fauconneau 1	B	12	Vidal 539	V	2,5
Burdin 4 716	B	10	Vidal F. B.	V	2
Gros Pinot	C	7	Vidal 83 T	V'	2
Gamay	C	10	Vidal 100	V'	1,5
Malbec	C	8,5	Vidal 92 T	V'	2
Cabernet	C	10	Vidal 614	V'	2
S 54 55	D	8,5	Ravat 6	R	3,5
S 10 878	D	3	Sauvignon	C	4,5
S V 18 315	D	5	Sémillon	C	6
S 8745	D	7	S 12 303	D	5
S 8357	D	8	S 12 309	D	6
S 7053	D	11	Folle-Blanche	D	5
Landot 1678	E	10	S 12 375	D	5,5
J. S. 15875	E	10	J. S. 16150	E	11,5
S. 13 666	E	11,5	Meynieu 6	E	10
Landot 1660	E	4	S V 27291	E	7,5
Landot 3474	E	9	Landot 2282	E	11
Burdin 4716	E	7	S V 23512	E	6
Landot 4465	E	6,5	Landot 2281	E	8,5
Landot 4511	E	4	Meynieu 6	F	15
Landot 3381	E	4	J S 14924	F	15
Landot 2 517	E	4	S V 3056	G	12
Meynieu 3	F	6	J S 12428	G	12
Landot 2283	F	4	S 11803	G'	11
S 14 596	F	7	S 9110	P	3,5
Burdin 7 334	F	7	Vidal 256	P	12
Burdin 7380	F	10			
S V 23369	F	3,5			
Burdin 5833	F	7			
S V 19159	F'	4,5			
S V 18283	G'	5			
J S 30662	G'	9			

Nota. — Chaque lettre représente un type de terrain.

entre 2 et 4 p. 100. Un seul échantillon possédant un sous-sol de terre rouge a présenté à l'analyse une teneur légèrement supérieure à 7 p. 100 en fer. Les vins de différents cépages en provenance de ce terrain contenaient en moyenne 8, 5 mg de fer total par litre pour les vins rouges et 5,2 mg pour les vins blancs, ce qui représente évidemment une richesse déjà élevée, mais nous avons enregistré avec les mêmes cépages pour d'autres terrains contenant 3 p. 100 de fer des richesses égales et même supérieures.

Nous nous sommes alors demandé si la dose de fer n'était pas en relation avec certains éléments comme le phosphore et le potassium. Les dosages de Phosphore et de Potasse assimilable, ont été faits suivant la méthode de BARBIER (4 et 5), dont les résultats sont toujours assez en relation avec les engrais épandus par les viticulteurs. L'analyse physique des terrains a été conduite suivant la méthode « pipette » (6) et les résul-

tats obtenus ont été groupés dans le tableau II en regard des teneurs en fer des récoltes effectuées sur ces terrains.

TABLEAU II

Champ d'exp.	P_2O_5	K_2O	pH	CO_3Ca	Limon	Argile	Sable	Fer dans les vins
1	10	60	6,7	1,5	305	120	485	Rouge 9/10. Blanc 6/9.
2	8	70	7,5	10,4	382	5,5	460	Blanc 2/2,5.
3	6	70	7,8	95	460	12,5	540	Blanc 1,7/2.
4	4,5	20	8	95	275	7,5	520	Blanc 3,5.
5	20	20	7,8	66,4	105	55	730	Rouge 7/10. Blanc 7,5/6.
6	12	40	6,5	2	92,5	15	797	Rouge 8/11.
7	7	20	8,3	233	402	42,5	225	Blanc 5/5,5.
8	19	65	7,5	13,4	240	1	677,5	Rouge 8/11. Blanc 8/12.
9	19	50	7	1	222,5	2,5	725,3	Rouge 7/10. Blanc 15.
10	5,5	55	6,6	3	155	12,5	670	Rouge 3.
11	12	7,5	8,3	104	63	2	597	Rouge 9. Blanc 12.
12	13	45	6,8	5	72,5	20	751	Rouge 6,.5 Blanc 11.
13	13	15	7,5	30	10	612,5	195	Blanc 12.

Les chiffres de ce tableau s'entendent de la façon suivante : P_2O_5 et K_2O sont donnés en milligrammes par litre d'extrait dans la solution acéto-acétique de MORGAN. Rappelons à ce sujet qu'à un litre de la solution de Morgan correspondait une prise d'essai de 500 g de terre sèche. Les chiffres donnés en ce qui concerne le carbonate de calcium, l'argile, le limon et le sable s'entendent en grammes pour 1000, enfin les chiffres concernant le fer correspondent à des milligrammes par litre de vin.

Bien qu'on ne relève pas dans ce tableau des chiffres qui se correspondent avec une rigueur mathématique, on peut néanmoins classer les vins en deux catégories comme le montre le tableau III.

TABLEAU III

Doses de P_2O_5 dans le sol

dans les vins contenant moins de 6 mg de fer/litre	dans les vins contenant plus de 6 mg de fer/litre
7	10
6	20
4,5	12
7	19
5,5	19
	13
	12
	13
	13
	19
	19

Or dans l'étude des besoins du sol en acide phosphorique selon la méthode Morgan, on a coutume de considérer qu'un sol contient suffisamment de phosphates lorsque l'extrait acéto-acétique contient plus de 8 mg de P_2O_5 par litre (6). Il semble bien qu'une certaine carence de P_2O_5 dans le sol diminue la teneur en fer de la récolte prélevée en cet endroit. Des essais systématiques, qui sont en cours, nous permettront de vérifier ces résultats.

Si la présence d'une certaine quantité d'acide phosphorique dans le sol contribue à rendre le fer plus facilement assimilable pour la vigne, on aurait pu espérer découvrir un rapport entre l'acide phosphorique et le fer du vin. Nous avons effectué sur nos vins des dosages d'acide phosphorique minéral puis total après minéralisation par voie sèche. Nous donnerons un aperçu de ces résultats dans le tableau IV.

TABLEAU IV

Rapport acide phosphorique/fer dans les vins

Vins n°	P_2O_5 minéral mg/l	P_2O_5 total mg/l	Fer total mg/l
12	100	150	9
40	100	110	6
63	235	250	12
58	150	160	15
29	150	200	2
15	175	200	2,5
26	200	225	2
22	50	60	2
46	150	200	10
14	20	50	2
52	125	200	11
56	60	75	8,5
18	150	200	11,0
55	175	375	6,0
61	325	450	12
73	100	175	15

Ces expériences ont donc porté sur différents cépages sans tenir compte des sols où ils avaient été cultivés et il n'en ressort aucun rapport entre les doses de phosphore et de fer. Ceci est logique car ainsi que nous l'apprend la littérature, la répartition du phosphore dans les différentes parties de la vigne n'est pas la même que celle du fer, et ces chiffres eussent peut-être été plus suggestifs si les analyses avaient été effectuées comme celles de CORDONNIER pour le fer directement sur les différents éléments de la grappe. Nous allons donc poursuivre des essais dans ce sens.

Si nous avons trouvé des teneurs en fer voisines dans les sols étudiés, les vins produits en possédaient des doses différentes. En première approximation il apparaît que certaines doses d'acide phosphorique assimilable dans le sol seraient susceptibles d'améliorer sensiblement l'assimilation du fer par les raisins.

Il semble donc bien en définitive, que la richesse du vin en fer pour un cépage donné soit liée dans une certaine mesure à la qualité du sol dans lequel il est cultivé.

III. — ENRICHISSEMENT AU COURS DE LA VINIFICATION

Nos recherches ont été conduites dans les caves d'entreprises privées ou de coopératives. Les résultats sont analogues et nous les résumons en décrivant une seule série d'expériences.

Les raisins après avoir été cueillis étaient stockés dans des douils puis pressurés dans des délais variant de dix à douze heures. A la surface de chaque récipient nous avons prélevé quelques grappes dont le jus a été ensuite analysé. Les échantillons provenant de six communes différentes ont donné les résultats suivants :

Tableau V

Commune	Fer en mg/litre de jus de raisin
Grand Yversais	1
Vendeuvre	1
Blaslais (1)	2
Blaslais (2)	1
Villiers	1
Neuville	1,5

Puis la vinification a commencé et nous avons effectué dans la cave des prélèvements de 20 en 20 minutes à la sortie des différents appareils. Les analyses de ces différents prélèvements ont donné les moyennes ci-dessous :

Tableau VI

Lieux de prélèvement	Fer en mg/litre
Sortie du fouloir	8
Sortie de l'égouttoir	9
Sortie du pressoir vertical.	12
Sortie de la presse continue	10

Nous remarquons donc ici que l'enrichissement le plus important se produit sur les rouleaux du fouloir puisque le vin y gagne en moyenne 7 mg de fer par litre. Or la cave où a eu lieu ce contrôle a vinifié avec le même appareillage 125.000 hectos ce qui représente :

$$0{,}007 \times 12\,500\,000 = 87\,500 \text{ grammes de fer}$$

soit une dissolution totale de 87,5 kg de fer si ce métal provient de l'appareillage. Or cet apport de fer ne peut provenir uniquement du fouloir composé de quatre rouleaux et pesant au total 200 kg environ, cela représenterait une perte de l'ordre de 20 kg par rouleau et on n'observait pas à l'œil nu de traces d'usure sensible.

L'enrichissement dans les autres parties de la cave est relativement peu important, il peut provenir des différents contacts métalliques. Les chiffres plus élevés obtenus à la sortie des presses et des pressoirs correspondraient assez bien à un enrichissement dû à un début d'extraction du fer des parties solides de la vendange (1), (rafles et pépins).

Étude comparée des lies

A la fin de la vinification, nous étions en possession de deux sortes de lies : celles qui provenaient du laboratoire, et celles qui provenaient des chais.

Les lies du laboratoire avaient une composition moyenne de :

68 p. 100 d'humidité ;

5 p. 100 de cendres (composées en grande partie de sels alcalins) ;

0,02 p. 100 d'insoluble dans l'acide chlorhydrique sur le produit sec.

Les lies provenant des chais avaient une composition moyenne de :

72 p. 100 d'humidité ;

7,5 p. 100 de cendres ;

4,4 p. 100 d'insoluble dans l'acide chlorhydrique sur le produit sec.

Il apparaît donc que les lies des chais ont subi par rapport à celles du laboratoire à un moment quelconque de la vinification un enrichissement en insoluble dans l'acide chlorhydrique qui peut atteindre 4,4 p. 100. Or ce dernier est formé principalement par de la silice et autres constituants résistants à cet acide qui ne peuvent avoir été apportés que par des traces des terres ayant souillé la vendange. Ceci implique le fait que le moût a été mélangé au cours de la vinification avec une certaine quantité de terre dont il aura pu dissoudre les éléments solubles et notamment le fer. Connaissant d'une part le pourcentage en insoluble dans l'acide chlorhydrique des lies et d'autre part la proportion de ce même insoluble dans les sols, il nous est possible de savoir quelle est la quantité approximative de terre entraînée et d'en déduire la contribution de la vendange à l'apport en fer.

Si par exemple on évalue la quantité de lies à environ 100 tonnes pour 50 000 hectos de vin, ceci donne environ 28 tonnes de matières sèches correspondant à :

$$\frac{4,4 \times 28}{100} = 1,23$$

soit 1 tonne 23 d'insoluble dans l'acide chlorhydrique ; si nous nous reportons aux analyses de terre de cette région, nous remarquons qu'elles contiennent à peu près 70 p. 100 d'insoluble dans cet acide. De sorte que 1 tonne 23 d'insoluble correspond à :

$$\frac{100 \times 1{,}23}{70} = 1 \text{ tonne } 75 \text{ de terre}$$

cette dernière avec une dose de 3 p. 100 de fer contient donc 52,5 kg de ce métal. Ce qui revient à dire que les 50 000 hectos de vin ont été intimement mélangés avec 52,500 kg de fer en combinaison au cours de leur vinification. Or ils n'en ont dissout que

$$\frac{87{,}5 \times 50}{125} = 35 \text{ kgs}$$

dont une faible partie provient des rouleaux du fouloir qui ont dû être attaqués très légèrement.

Remarquons ici qu'une quantité de 1,75 t de terre pour 50 000 hectos ne représente que 0,35 pour mille. Ce chiffre devrait en réalité être rapporté à la quantité de vendange, ce qui le rendrait bien plus faible et par suite plus plausible encore.

En résumé, le vin peut très bien être enrichi en fer par la terre qui souille la vendange, encore faudrait-il pour cela que ce dernier soit solide et c'est ce dernier point que nous avons voulu vérifier en laboratoire.

IV. — ENRICHISSEMENT EN LABORATOIRE

a) Enrichissement au contact du métal

Deux séries d'expériences ont été faites dans le but d'étudier la dissolution du fer métallique dans le vin. La première série a été réalisée avec des plaques de fer de 10 cm × 7 cm pesant en moyenne 31 g, qui avaient été décapées dans l'acide chlorhydrique à 20 p. 100 additionné d'un peu d'acide nitrique puis soigneusement lavées et séchées. Cette méthode est paraît-il susceptible de déposer à la surface du métal des ions chlore qui favorisent sa corrosion ; aussi avons-nous repris les expériences avec d'autres plaques de fer décapées avec une solution d'acide sulfurique à 7 p. 100 pendant quinze minutes à 60°C. Cette méthode comparativement à la précédente nous a fourni des enrichissements identiques.

Les rectangles de fer ont été tout d'abord suspendus chacun dans un récipient contenant 500 cc de moût en fermentation qui contenait 8 mg de fer par litre ; chaque plaque était entraînée dans un lent mouvement circulaire autour de son axe. Les résultats ont été les suivants (tableau VII).

TABLEAU VII

Enrichissement d'un moût en fermentation

Temps	mg de fer par litre de moût en fermentation
0	8
3 minutes	13
15 »	20
1 heure	49
2 »	65
3 «	80
4 »	90

Dans une deuxième série d'essais on a employé du vin au lieu de moût. Voici les résultats (tableau VIII).

Les vins et les moûts avaient été ajustés à 7,5 g d'acidité totale par litre. On voit que l'enrichissement des vins ou des jus de raisins au contact du métal peut prendre des proportions considérables, mais qu'il n'est pas très rapide. On peut objecter à cela qu'il reste toujours pendant toute la durée de la vinification un film de jus de raisin sur les différentes parties métalliques du matériel et que ce film est le lieu d'un enrichissement durable et continu. Mais malgré cela la dissolution du métal paraît difficilement pouvoir être responsable de l'enrichissement brutal que nous avons observé au fouloir.

TABLEAU VIII

Enrichissement d'un vin

Temps	mg de fer par litre de vin
0	3
3 minutes	5
15 «	10
1 heure	24
2 «	35
3 «	55
4 «	75

b) **Enrichissement au contact des terres**

Dans une première série d'essais, nous avons choisi deux terres stérilisées par un séchage préalable à 110°C pendant 8 heures, l'une « A » avait une teneur en fer de 8 p. 100, l'autre « B » de 3 p. 100. Dans ces expériences, 5 grammes de chaque échantillon furent mis en contact avec 500 cc de vin, l'ensemble était agité mécaniquement. Des prélèvements furent faits

à différents intervalles aux fins d'analyses. L'enrichissement en fer fut négligeable comme le montrent les résultats obtenus (tableau IX).

TABLEAU IX

Influence de fragments terreux stérilisés sur la richesse en fer d'un vin

Temps	Fer en mg par litre de vin	
	Terre « A »	Terre « B »
0	3	3
2 minutes	4,5	4,5
4 —	4	4
10 —	3,2	3
36 —	3,2	3
1 heure	3	3
4 —	5	5
6 —	6	6

Loin d'observer un enrichissement continu, on constate plutôt une légère diminution de la dose de fer dans le vin, on peut supposer que le fer dissous a tendance pendant une courte période à être adsorbé par l'alumine ou les argiles.

Avec le moût, les expériences conduites de la même façon donnèrent des résultats comparables (tableau X).

TABLEAU X

Influence des fragments terreux stérilisés sur la richesse du moût en fer

Temps	Fer en mg par litre de moût	
	Terre « A »	« Terre B »
0	9	9
3 minutes	10	10
10 —	9,5	9
1 heure	9,5	9
4 —	10	9,5

Il est donc bien évident que le fer naturellement contenu dans la terre n'est pas soluble dans les jus de raisin.

Cela n'est pas pour nous surprendre, car il existe principalement à l'état de sels ferriques très peu solubles dans les solutions d'une acidité modérée. Mais ne se peut-il pas que dans certains cas, ce fer puisse être réduit à l'état ferreux et devenir de ce fait soluble. R. BETREMIEUX (7), à la suite d'une intéressante série d'expériences est amené à dire : « ... une activité microbienne intense, s'exerçant aux dépens d'une quantité importante de glucose au sein d'une masse de terre entraîne d'abord la

réduction puis la solubilisation consécutive à la réduction d'une partie du fer de certains éléments de la terre. »

Nous avons pris 5 g de chacune des terres « A » et « B ». Ces échantillons furent déposés dans des boîtes de Pétri, ensuite ensemencés par 5 gouttes de moût en fermentation puis arrosés 4 fois de deux heures en deux heures avec une solution contenant 50 g de glucose et 5 g de sulfate neutre d'ammonium par litre pour subvenir aux besoins en azote des microorganismes de ces sols et des levures. Les boîtes de Pétri furent placées dans une étuve à 22° pendant 5 jours, l'humidité de la terre était entretenue après la dernière addition de solution sucrée par la quantité nécessaire d'eau distillée. Puis le contenu de chaque boîte de Pétri fut mélangé avec 500 cc de moût en fermentation dont l'acidité totale était de 7,5 g. Des prélèvements faits au cours du temps ont donné les résultats suivants (tableau XI).

TABLEAU XI

Enrichissement en fer d'un moût par l'apport de terre non stérile

Temps	Fer en mg par litre de moût	
	Terre « A »	Terre « B »
0	8	8
3 minutes	25,5	23,5
18 —	26	23,5
30 —	26	24
1 heure	26	24
36 —	37	35,5
60 —	52	50

On remarquera dans ce cas un enrichissement de 17 mg par litre en moins de 3 minutes, cet enrichissement est énorme par rapport à celui que nous avions observé, mais il est peu probable que la vendange puisse se charger de quantités de terre approchant 1 p. 100.

Les mêmes expériences conduites avec du vin fournirent un enrichissement du même ordre. Il faut donc pour que le fer de la terre puisse se dissoudre dans le jus de raisin qu'un travail de microorganismes l'ait ramené à l'état de sel ferreux soluble.

Examinons maintenant ce qui se passe au cours des vendanges. Au préalable une mince pellicule de boue avait été projetée sur les basses grappes, par les pluies et les façons culturales. Lors de la vendange une quantité plus importante de terre fut entraînée dans les douils. Au mois d'octobre la saison chaude et humide permet dans la terre une activité appréciable des microorganismes qui au contact des exsudats sucrés des grappes prennent un regain d'activité intense et sont aidés dans leur travail par les levures. Le résultat de cette activité dans les douils est une

réduction notable des traces de fer contenues dans les terres. Ces effets réducteurs sont nettement perceptibles par l'odeur dégagée des récipients malpropres servant au transport des raisins.

Aussi le passage dans le fouloir qui permet un contact intime entre la terre et le jus suffit-il pour enrichir en un instant les moûts de plus de 7 mg de fer par litre. Ceci avait tout d'abord échappé à nos investigations car nous avions prélevé à la surface des douils des grappes qui secouées pendant le transport s'étaient trouvées débarrassées de toute trace de terre.

V. — CONCLUSION

Nous ne pouvons ici que confirmer la double origine du fer dans les vins.

En ce qui concerne l'origine biologique du fer, les teneurs du jus de raisin en ce métal seraient d'autant moindres que la terre présenterait une carence en acide phosphorique.

Quant à l'apport extérieur nous avons mis en relief l'influence de la terre qui peut souiller les grappes et dont le rôle s'est montré plus important que celui du matériel vinicole métallique.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

(1) Cordonnier (R.). — Le fer et ses origines dans le vin. *Ann. Technologie Agr.*, **16**, 1, janvier-mars 53.
(2) Ferré (L.) et Michell (A.). — Dosage colorimétrique des sels ferreux et ferriques dans les vins blancs. *Ann. Fals. Fraudes*, 1953, **26**, 18.
(3) Ribereau-Gayon (G.). — Dosage colorimétrique du fer total et du fer trivalent dans les vins rouges. *Ann. Fals. Fraudes*, 1933, **26**, 297.
(4) Morgan (C. R.). — 3e congrès international Sc. du sol. Oxford vol. I, 1935, p. 103.
Connecticu Agr. Exp. Station, Bull, 392, New-Haven (1937).
(5) *Ann. Agron.* nouvelle série, **11**, 1941, p. 208.
(6) Robinson (G. W.). — *Journ. of Agric. Sc*, **12**, 1932, p. 306. Actes de la IVe conférence intern. de Pédologie, Rome 1924, vol. II, p. 19.
(7) Betremieux (R.). — Étude expérimentale de l'évolution du fer et du manganèse dans les sols. *Ann. Agr.*, série A, n° 3, 2e Année, p. 194 295 (1951).

Les auteurs tiennent à remercier vivement Monsieur FLANZY, Directeur de la Station Centrale de Recherches sur l'Œnologie, la Cidrerie et les Jus de Fruits de NARBONNE, pour les précieux conseils qu'il leur a apportés au cours de la réalisation de ce travail.

PRÉPARATION DE PRÉSURE CRISTALLISÉE A PARTIR D'ESTOMACS DE VEAUX (CAILLETTES)

PAR

C. ALAIS

Station centrale de Microbiologie et Recherches laitières, Jouy-en-Josas.

Une méthode simple de préparation de présure cristallisée a été décrite par BERRIDGE et WOODWARD (1). Ces auteurs ont employé comme matière première la présure commerciale de la maison anglaise Benger's Ltd. A la suite de l'échec de plusieurs tentatives de préparation, dans d'autres laboratoires à partir de produits différents, l'opinion a été émise que cette méthode ne pouvait réussir qu'avec la présure BENGER (2) et (3).

Nous avons été amenés à préparer la présure à l'état cristallisé afin de disposer d'une réserve d'enzyme pur, destiné aux recherches que nous poursuivons sur l'action de la présure sur la caséine. Dans la préparation décrite ci-dessous, nous sommes partis de caillettes du commerce, avec lesquelles nous avons obtenu une solution de présure, après un traitement simple et l'emploi de produits chimiques réduits au minimum pour avoir un liquide limpide et dont l'activité coagulante ou « force » soit à peu près celle de l'extrait de présure du commerce à 1/10 000. Sur cette solution nous avons appliqué la méthode simplifiée de BERRIDGE.

Mesure de l'activité coagulante (ou « Force » de la présure)

Nous avons adopté à la fois le terme « activité », la technique de mesure et l'expression en « unité-présure » selon BERRIDGE (4). Il est utile de faire un effort de standardisation car il règne beaucoup d'imprécision en ce domaine.

Rappelons que l'unité-présure représente l'activité de la présure contenue dans un centimètre cube de dilution qui coagule 10 cc de substrat standard en 100 secondes à 30°C. Le substrat est une solution de 12 g de poudre de lait écrémé, obtenue par le procédé « Spray », dans 100 cc de solution 0,02 N de chlorure de calcium.

On peut établir une formule générale :

$$(1) \qquad \text{U.P.} = \frac{10\,V}{pt}$$

ou V = volume de substrat (10 cc) ; p = quantité de présure ; t = temps de coagulation en sec.

Il est difficile de passer des unités-présure à l'expression française de « force » (volumes de lait « frais et normal » coagulés par un volume de présure en 40 minutes à 35°), parce qu'il est difficile de faire un rapport entre le temps de coagulation du lait artificiel de BERRIDGE — qui varie peu d'un essai à l'autre — et le temps de coagulation du lait « frais et normal » qui varie notablement comme cela est bien connu. Par contre il est plus facile de faire un rapport entre le temps à 30° et celui à 35°.

En faisant la moyenne de 20 essais comparatifs échelonnés sur 6 mois, en prenant le lait de mélange du troupeau laitier du Centre de Recherches Zootechniques de Jouy-en-Josas, nous avons trouvé :

$$T \text{ lait} = t \text{ substrat} \times 1{,}964$$
$$T\ 30^\circ = T\ 35^\circ \times 1{,}39.$$

Sur ces bases, le temps t à employer dans la formule (1) lorsqu'on a obtenu le temps T avec le lait à 35° selon la méthode habituelle est :

$$t = T \times 0{,}708$$

et 1 U. P. (unité-présure) représente une « force » de 170. (Une solution de présure de force 1 000 contient 5,88 U. P. par cc).

Préparation de la solution de présure avec les caillettes de veaux

Deux douzaines de caillettes propres et sèches, raccourcies largement pour éliminer les deux extrémités, puis découpées en lanières de 1 cm de large, fournissent 1010 g de fragments (42 g pour une pièce).

Ces fragments sont mis à macérer brièvement dans 10 litres de saumure à 10 p. 100 de chlorure de sodium, tiédie à 30°, sous agitation mécanique continue ; le pH est maintenu au voisinage de 5 par addition d'acide chlorhydrique N. Après 6 heures les peaux sont séparées par passage sur une toile métallique. Il s'écoule rapidement 8,85 litres de liquide trouble mais peu chargé en matières mucilagineuses ; l'activité est 20 U. P./cc et le pH 4,95. L'activation de l'enzyme est accélérée en abaissant le pH à 4,85, après 5 jours l'activité est à peu près stable : 61 U. P./cc.

La solution brute est traitée par 5 p. 100 en volume d'une solution d'alun de potasse à 10 p. 100, le pH tombe à 3,41 et aussitôt après il est remonté à 5,9 avec une solution de phosphate disodique à 10 p. 100. La dilution due aux réactifs est de 18 p. 100. Après filtration on obtient une solution jaune limpide, dont l'activité est 54,5 U. P./cc et le pH 5,92.

Préparation des cristaux

Nous suivons la méthode indiquée par BERRIDGE (1), avec quelques modifications de détail que nous précisons.

La solution de présure précédente : 8,6 litres, 469 000 U. P. au total est saturée par addition progressive, sous agitation, de chlorure de sodium (250 g/l). Après une nuit de repos à température ambiante le liquide surnageant le précipité jaune brun est filtré (filtration rapide et efficace sur des filtres en papier Schleicher-Schull n° 2040 b). Le filtrat est éliminé.

Les filtres sont désagrégés avec un peu d'eau dans un broyeur, la pâte est passée sur un grand entonnoir en verre fritté n° 1 et épuisée à l'eau en s'aidant du vide. Le liquide obtenu est jeté sur le précipité de la première saturation, après agitation il reste un dépôt insoluble qui est éliminé par filtration. On obtient 2 litres de solution légèrement opalescente à pH 5,93.

On fait une deuxième saturation à pH 5,4 à travers une membrane de cellophane (Visking cellulose) de 38 millimètres de diamètre, tournant lentement dans une grande éprouvette contenant la solution, à la température ambiante. Après 48 heures la densité se fixe à 1,19. On sépare par centrifugation ce que BERRIDGE appelle un « précipité granulaire » ; dans notre cas c'est un dépôt crémeux volumineux qui paraît hétérogène. Le surnageant reste trouble mais ne dépose plus. On vérifie que le liquide saturé qui gonfle le boyau de cellophane n'a pas d'activité appréciable.

Le précipité est repris dans 120 cc d'eau, il ne donne pas une solution vraie. On obtient un liquide jaune sale trouble qui abandonne un léger dépôt mucilagineux mais qui ne cristallisera pas, même après avoir été maintenu plusieurs jours au réfrigérateur.

Cette solution non cristallisable est diluée et saturée une nouvelle fois de la même façon. Le liquide surnageant est plus clair et le précipité amorphe plus homogène, sa solution est cependant trouble et ne cristallisera pas au réfrigérateur.

On procède à une nouvelle saturation. Cette fois le précipité se forme en flocons presque blancs ; avec 80 cc d'eau la solution est encore trouble mais beaucoup moins que précédemment. Entre le 3e et le 4e jour seulement, la cristallisation commence nettement sur les parois du verre. Par centrifugation on rassemble une couche blanche de cristaux avec quelques particules grises.

Les cristaux séparés sont repris avec 45 cc de tampon acétate 0,1 M à pH 5,4 ; ils ne restent pas en suspension mais se déposent rapidement dès que l'agitation cesse. Il n'a pas été fait de prélèvement pour mesurer l'activité à ce stade. Le traitement est poursuivi comme l'indique BERRIDGE. Nous obtenons le même rendement avec la solution des cristaux dialysée et centrifugée : 12,3 p. 100 ; mais au stade de la deuxième cristallisation le rendement : 9,75 p. 100 est plus élevé que celui indiqué par cet auteur. Au microscope on observe des cristaux de forme cubique, avec des fragments irréguliers.

Avant de procéder à l'analyse, une 3e cristallisation est faite de

la façon suivante. Les cristaux sont dissous dans 100 cc de tampon phosphate 0,2 M à pH 6,8 ; la solution est filtrée, le pH ramené à 5,4 et l'on sature avec NaCl à travers un petit boyau de cellophane de 16 mm de diamètre. Le précipité blanc amorphe est dissous dans l'eau froide, 50 cc. La dissolution est très lente et imparfaite, on élimine un petit dépôt blanc amorphe par centrifugation. Le lendemain la cristallisation commence, elle se poursuit longtemps, l'activité du surnageant diminue encore 15 jours après.

L'activité et le rendement aux stades successifs de la préparation sont donnés par le tableau suivant :

	Activité totale	% de l'activité première
	—	—
Solution des caillettes (8, 6 litres)	469 000	100
1er précipité	317 300	67,7
2e précipité (granulaire)	193 500	41,2
3e précipité (granulaire)	167 000	35,6
4e précipité (granulaire)	117 000	25
Cristaux après dialyse et centrifugation	57 600	12,3
2e cristallisation	45 760	9,75
3e cristallisation	24 350	5,2

Caractéristiques des cristaux de présure

Activité par rapport à la teneur en azote et en extrait sec. — On prélève à la pipette une partie des cristaux suspendus dans un peu de surnageant, on amène à dissolution dans le tampon de phosphate de potassium 0,2 M, pH 6,8.

L'azote est dosé par la méthode micro-kjeldahl en prenant pour blanc d'analyse le tampon. L'extrait sec est obtenu sous vide à 99-100°, en tenant compte du résidu sec laissé par le tampon dans les mêmes conditions et des traces de NaCl restant dans le surnageant, déterminées par un dosage.

Pour 1 cc de suspension :

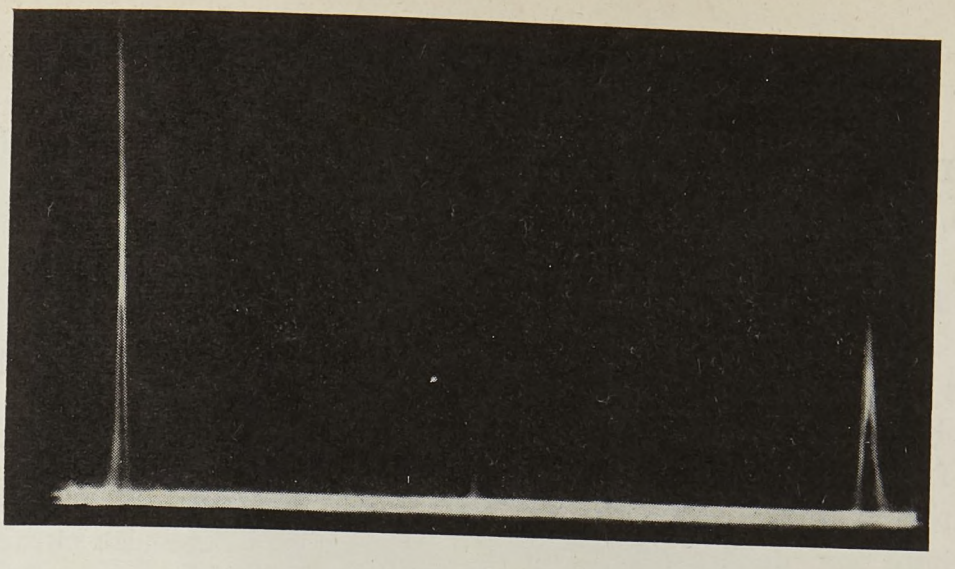
N	3,98	mg
E. S.	26,45	mg
Activité	1,424	U. P.
U. P./mg N	357,7	
U. P./mg E. S.	53,8	
N % E. S.	15,05	

La 3e récolte représente 450 milligrammes d'extrait sec de cristaux de présure.

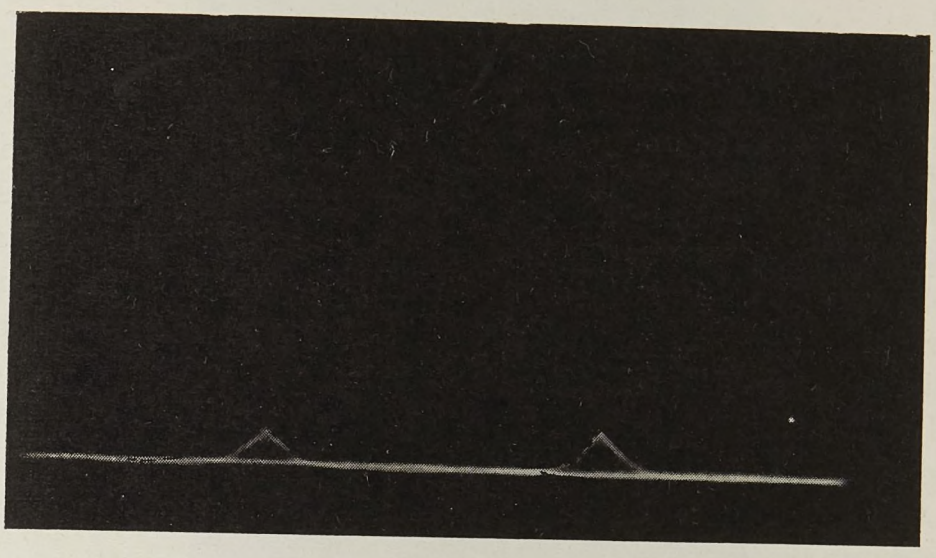
Exprimé selon la définition française le pouvoir coagulant des cristaux secs correspond à une « force » de 1/9 millions.

Examen électrophorétique [1], selon TISELIUS, avec l'appareil Fokal-Strubin ; le diagramme représenté ici (fig. 1) montre que la préparation est homogène.

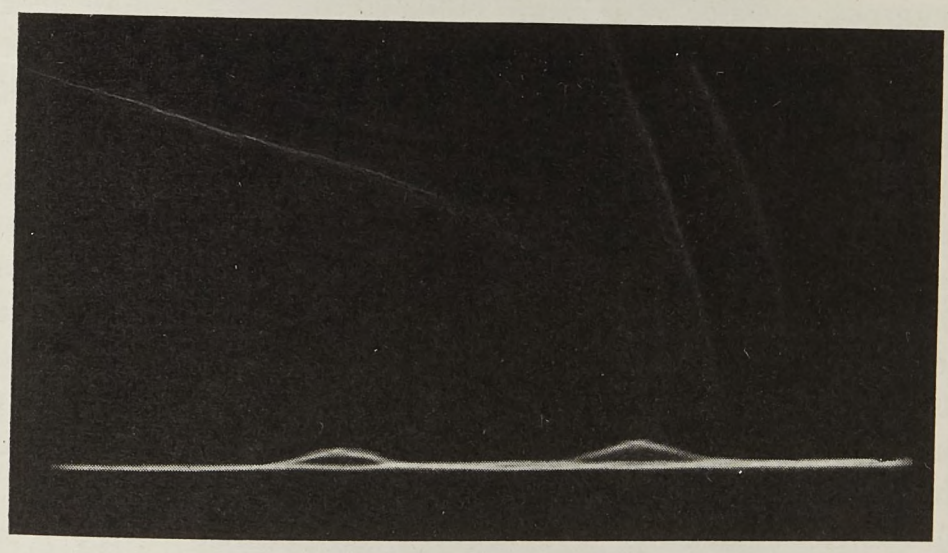
[1] Examen effectué par le service d'électrophorèse du C. N. R. S. que nous sommes heureux de remercier.



Temps o



Temps : 7.500 secondes



Temps : 15.000 secondes

FIG. 1

Examen électrophorétique

Tampon phosphate 0,1 M. I = 20 mA. E = 240 volts
Conductibilité tampon = 0,00561 Gradiant de potentiel = 4.75 V/cm
Mobilité électrophorétique = 5,1 (cm^2. $volt^{-1}$. sec^{-1}) 10^{-5}

La Micro-photographie des cristaux, en contraste de phase (fig. 2 et 3), montre les formes cubiques décrites par BERRIDGE.

Solubilité. Comme l'indique BERRIDGE, les cristaux sont peu solubles. Dans l'eau la solution paraît saturée avec une activité de 32 U. P./cc. Dans le tampon phosphate 0,2 M, pH 6,8, après un contact de 24 heures la solution a une activité de 270 U. P./cc.

La solution aqueuse des cristaux, conservée au réfrigérateur, sans addition d'antiseptique, présente une bonne stabilité. Après un mois l'activité demeure inchangée, après 3 mois on constate une chute d'activité de 12 p. 100, après 4 mois de 17 p. 100.

Discussion

La méthode simplifiée de BERRIDGE permet d'obtenir des cristaux de présure en partant d'estomacs de veaux comme matière première à condition de prolonger les opérations de purification par précipitations successives de la présure sous la forme amorphe. Malgré cette complication le rendement est le même que celui indiqué par BERRIDGE en partant d'une présure commerciale.

Il faut noter que nous n'avons pas utilisé de faibles valeurs de pH pour faciliter l'élimination des mucines.

La teneur en azote dans la substance sèche, soit 15 p. 100, correspond à celle d'une protéine.

L'activité par rapport à l'azote est plus faible que celle indiquée par BERRIDGE (4) pour les cristaux obtenus selon sa première méthode de purification et de cristallisation.

On peut également signaler que VARIN et ZAHLER (5) et (6) opérant sur une préparation déjà ancienne de la présure cristallisée de BERRIDGE ont obtenu 250 et 226 U. P./mg N, (la détermination de BERRIDGE rapportée à l'azote donne 1 120 U. P./mg N). Toutefois VARIN et ZAHLER ont opéré à 35° sur du lait écrémé frais et non à 30° sur le lait en poudre.

D'après les résultats que nous avons donnés au début de notre travail, le rapport entre le temps de coagulation à 30° avec le lait en poudre et le temps de coagulation à 35° avec le lait écrémé se situe vers 0,708. Si l'on adopte ce chiffre et que l'on exprime les unités-présure par mg d'azote les résultats des différents auteurs sont les suivants :

a) Présure cristallisée de BERRIDGE : BERRIDGE, 1945 : 1 120 ; VARIN, 1950 : 353 ; ZAHLER, 1952 : 319.

b) Notre présure cristallisée : 358.

Il se peut que les écarts entre ces différents résultats dépendent du mode de préparation de la présure ? Cependant il est permis de penser

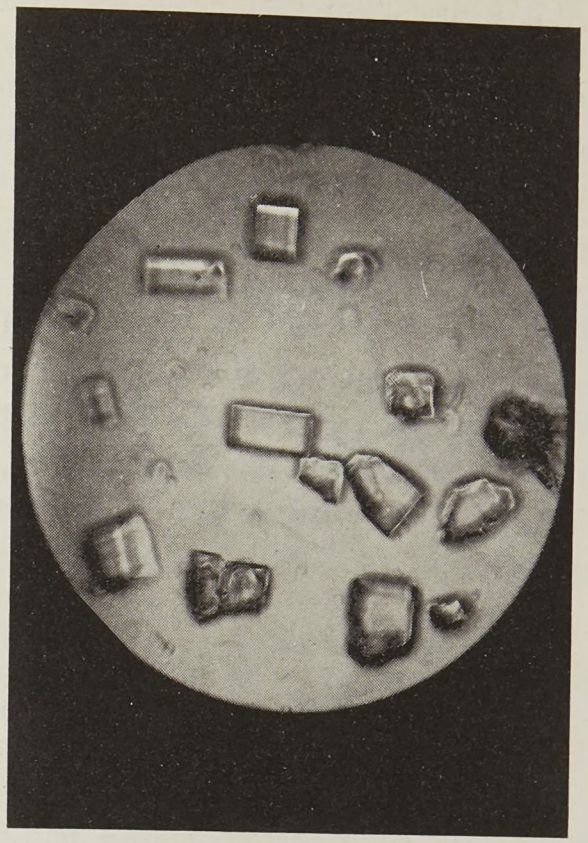


FIG. 2

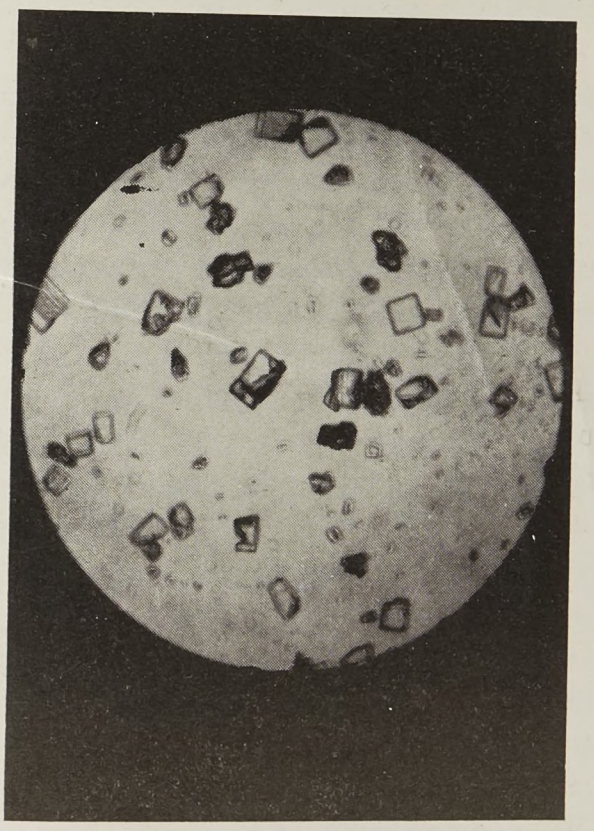


FIG. 3

qu'ils tiennent plutôt à des différences entre les laits utilisés pour la détermination de l'activité : BERRIDGE, en 1945, a utilisé un lait desséché d'excellente qualité, n'ayant pas subi le préchauffage. Nous n'avons pas pu obtenir un produit semblable pour nos essais et nous avons utilisé un lait desséché par le même procédé (Spray) mais ayant subi un préchauffage.

Résumé

Des cristaux de présure ont été obtenus à partir de caillettes de veaux en suivant la méthode simplifiée de BERRIDGE. Les principales caractéristiques de ces cristaux ont été déterminées.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

(1) BERRIDGE (N. J.) et WOODWARD (C.). — A simple method for preparing crystalline rennin. *J. Dairy Res.*, **20**, 255-257, 1953.
(2) BERRIDGE (N. J.). — Communication personnelle (1954).
(3) HOSTETTLER (H.) et STEIN (J.). —Beitrag zum Vorgang der Labgerinnung und zur Frage der Labstärkebestimmung. *Landw. Jb. Schweiz.*, **68**, 291-368, 1954.
(4) BERRIDGE (N. J.). — Thepurification and crystallization of rennin. *Biochem. J.*, **39**, 179-186, 1945.
(5) VARIN (R.). — Thèse, Berne 1951.
(6) ZAHLER (P.). — Thèse, Berne 1953.

Le Directeur-Gérant : B. LACLAVIÈRE.

Imprimerie BUSSIÈRE à Saint-Amand (Cher), France. — 20-4-1955
Dépôt légal : 2e trimestre 1955 *N° d'impression : 740*

INFLUENCE DU CHAUFFAGE DU LAIT SUR LE DÉVELOPPEMENT DES BACTÉRIES

I. — CROISSANCE DES BACTÉRIES LACTIQUES DANS DES LAITS CHAUFFÉS A DES TEMPÉRATURES VARIABLES

PAR

J. E. AUCLAIR et A. PORTMANN

Station centrale de Microbiologie et Recherches laitières
Jouy-en-Josas

INTRODUCTION

Il est bien connu que le lait subit par chauffage un ensemble de modifications qui le rendent en général plus apte à la croissance des bactéries que l'on y ensemence ultérieurement. On sait en particulier que le lait cru contient des substances bactériostatiques, les « lacténines », qui sont détruites totalement par un chauffage de vingt minutes à 75°.

Les lacténines L_1 et L_2 sont actives particulièrement sur *Streptococcus pyogenes* et c'est en utilisant cet organisme que nous avons pu doser ces substances, étudier quelques-unes de leurs propriétés et obtenir enfin des préparations concentrées des lacténines (1, 2, 3).

En ce qui concerne les bactéries lactiques, il semble bien que les divers phénomènes d'inhibition de ces bactéries par le lait cru, étudiés par de nombreux auteurs (voir par exemple 4, 5, 6, 7, 8, 9) relèvent principalement de l'action des lacténines car les températures et les temps de chauffage généralement cités pour l'inactivation de l'effet inhibiteur du lait cru correspondent assez bien aux conditions thermiques de destruction de ces substances (3).

Il n'est pas impossible cependant que des substances bactéricides autres que les lacténines soient en jeu. D'autre part les résultats de plusieurs auteurs (4, 5, 7, 10, 11) suggèrent qu'en dehors de la destruction des substances inhibitrices il apparaît au cours du chauffage du lait, et spécialement aux températures supérieures à 100°, des substances qui ont pour effet de favoriser la croissance des bactéries lactiques.

Orla-Jensen et Jacobsen (4) ont probablement été les premiers à différencier nettement l'action des substances bactéricides thermo-

labiles du lait (dont les températures de destruction correspondent à celles des lacténines) de l'effet favorable qu'un chauffage au-dessus de 100° exerce sur la croissance des bactéries lactiques et en particulier des lactobacilles. Ils attribuaient cet effet activant à la destruction par le chauffage de substances bactéricides thermorésistantes du lait et peut-être, dans une certaine mesure, à des transformations des albumines et du lactose au cours du chauffage. Ces mêmes auteurs remarquaient cependant qu'un chauffage du lait à haute température (115°) pouvait avoir un effet défavorable sur la croissance des streptocoques (*Str. cremoris, Str. agalactiae, Str. liquefaciens*) et qu'un chauffage encore plus poussé (130°) pouvait avoir également un effet néfaste sur le développement des lactobacilles.

L'action du chauffage du lait à haute température (au-dessus de 100°) a été étudiée en particulier par TYLER et WEISER (10) et FOSTER (11). Ces auteurs constataient dans l'ensemble une action favorable du chauffage du lait sur la croissance ultérieure de la plupart des bactéries lactiques utilisées (streptocoques et lactobacilles) mais tandis que les premiers attribuaient ce fait à une baisse du potentiel d'oxydo-réduction du lait au cours du chauffage, FOSTER établissait une corrélation entre l'effet activant du chauffage et l'augmentation de la teneur du lait en azote non protéique, résultant d'une hydrolyse partielle de la caséine. Cet auteur observait de plus, comme ORLA-JENSEN, l'action néfaste que peut exercer un chauffage très sévère du lait sur la croissance ultérieure de certaines bactéries (*Str. liquefaciens, Lactobacillus casei*).

L'un de nous (12) a signalé à ce propos que le chauffage du lait à l'autoclave pouvait être nuisible à la croissance de *Str. agalactiae*. Cet effet était attribué à la disparition, à la suite du chauffage, de certains composés sulfurés nécessaires à la croissance de cet organisme et présents seulement dans le lait cru en petite quantité.

Dans les recherches qui vont être décrites nous avons comparé la croissance d'un petit nombre de bactéries lactiques dans des laits chauffés à des températures variables (60 à 120°) en vue d'étudier par quelles réactions le chauffage peut dans certains cas rendre le lait plus favorable au développement de certaines espèces bactériennes ou au contraire nuire à la croissance d'autres espèces de microbes.

MÉTHODES

Le lait utilisé dans ces expériences a été recueilli par traite aseptique sur des vaches dont les mamelles avaient été reconnues précédemment exemptes d'infection microbienne. Huit prélèvements ont été faits séparément sur trois vaches de race hollandaise (Pâquerette, Tulipe, Rose)

et deux vaches de race normande (Cabale et Badou), appartenant au troupeau laitier du Centre de Recherches zootechniques de Jouy-en-Josas.

Le lait était écrémé dans une écrémeuse préalablement stérilisée à l'autoclave, puis réparti en tubes de 18 × 180 mm par fractions de 5 ml. Ces tubes étaient ensuite chauffés soit par immersion pendant vingt minutes dans un thermostat réglé à la température choisie à 0,1° près pour les chauffages à température inférieure ou égale à 100° (60° — 65° — 70° — 75° — 80° — 90° — 100°), soit par maintien pendant vingt minutes à l'autoclave pour les températures supérieures à 100°, ces températures étant déterminées d'après les indications du manomètre de l'autoclave.

Les tubes de lait ainsi préparés étaient conservés dans une chambre froide (— 10° environ) jusqu'au moment de leur utilisation.

Les souches de bactéries utilisées étaient les suivantes : *Str. agalactiae* 1 B, *Str. lactis* X 13, *Str. lactis* 7 M 10, *Str. cremoris* 1 P 5, *L. lactis* O 37, et *Str. thermophilus* T J.

Chaque souche était, au cours d'un même essai, ensemencée dans 3 tubes de chacun des laits chauffés aux différentes températures. La dose d'inoculation utilisée, variable suivant les souches, avait été choisie au cours d'expériences préliminaires de façon que les cultures des différentes souches en lait stérilisé parviennent à la fin de leur phase logarithmique après 18 heures d'incubation à la température optima de croissance de chacun des organismes.

Après incubation dans un thermostat réglé à la température voulue (± 0,1°), le pH des cultures était déterminé à l'aide d'un pH-mètre à électrode de verre.

Le pH des cultures après incubation a été choisi comme mesure de l'activité des microorganismes utilisés, car il nous paraissait représenter, pour ces bactéries fortement productrices d'acide lactique, le critérium le plus important de leur activité métabolique. On sait d'autre part que la production d'acide par les bactéries lactiques est étroitement liée à leur croissance. Enfin la détermination du pH offrait, au point de vue pratique, l'avantage d'être très rapide et permettait d'effectuer un grand nombre d'essais en série.

RÉSULTATS

Les figures 1 à 6 montrent l'influence du chauffage du lait sur la croissance ultérieure des six organismes utilisés. L'acidité obtenue dans les cultures après 18 heures d'incubation est représentée en fonction de la température de chauffage du lait. Chaque point représente la moyenne de trois essais simultanés.

Nous observons tout d'abord que, pour un organisme donné, les courbes obtenues avec des échantillons de lait provenant de vaches différentes ou prélevés sur la même vache à des moments différents présentent des allures semblables.

Au contraire l'aspect de ces courbes varie essentiellement avec la souche de bactéries utilisée, chaque organisme présentant une courbe caractéristique.

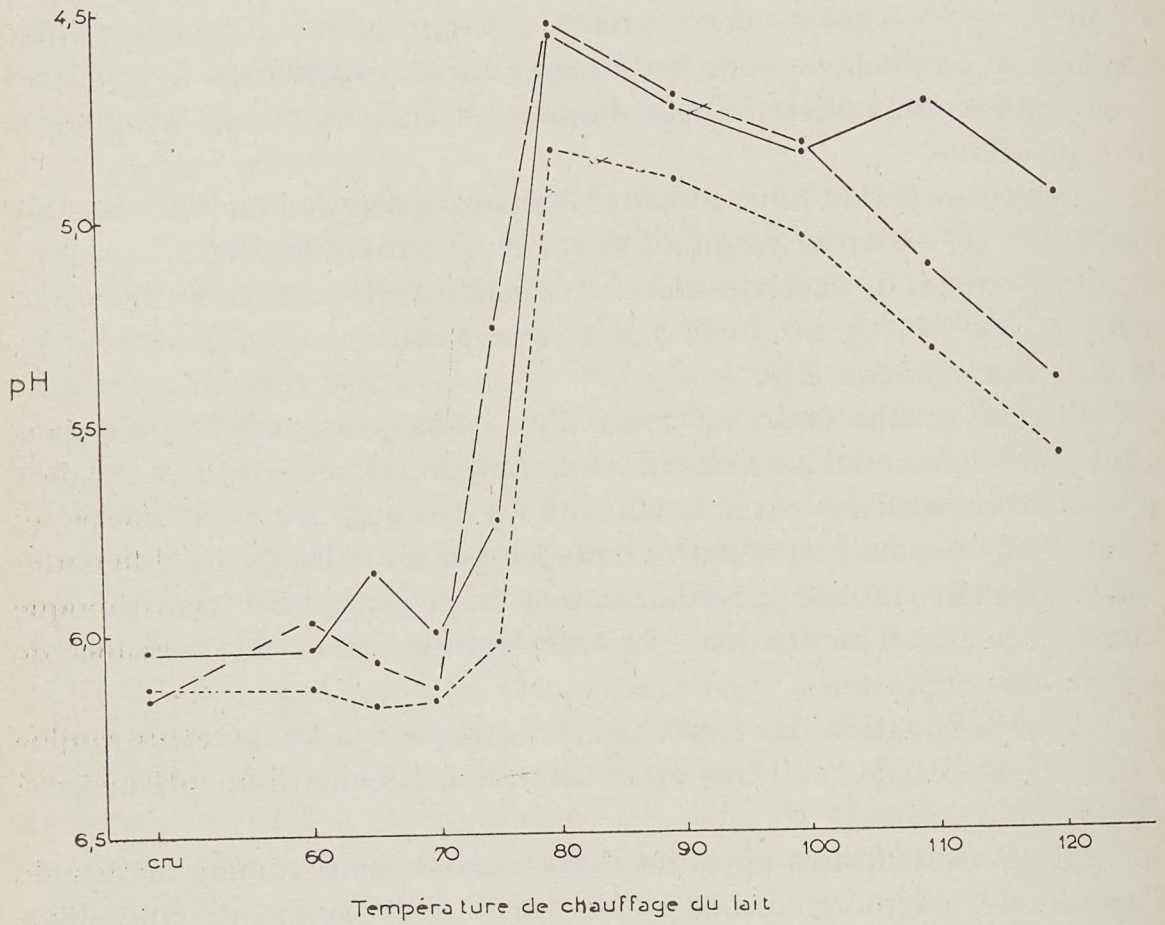


FIG. 1. — Croissance de *Streptococcus agalactiae* 1 B dans des laits chauffés à des températures variables.

——— Pâquerette (19-11-53)
— — — Rose (7-12-53)
- - - - - - Tulipe (10-12-53)
Ensemencement : $1/10^4$. Incubation : 18 heures à 37°.

Les courbes obtenues avec *Str. agalactiae* 1 B montrent que la croissance de cet organisme est maxima dans le lait chauffé à 80°, température de destruction de la lacténine L_2 (3). Au delà de 80°, la croissance de *Str. agalactiae* diminue à mesure que l'on augmente la température de chauffage du lait.

Pour *Str. lactis* X 13, la croissance augmente de façon presque continue lorsque l'on élève la température de chauffage du lait, depuis une croissance faible dans le lait cru jusqu'à un maximum dans le lait chauffé à 110 et 120°. On voit qu'un chauffage du lait à 60 ou 65° pendant vingt

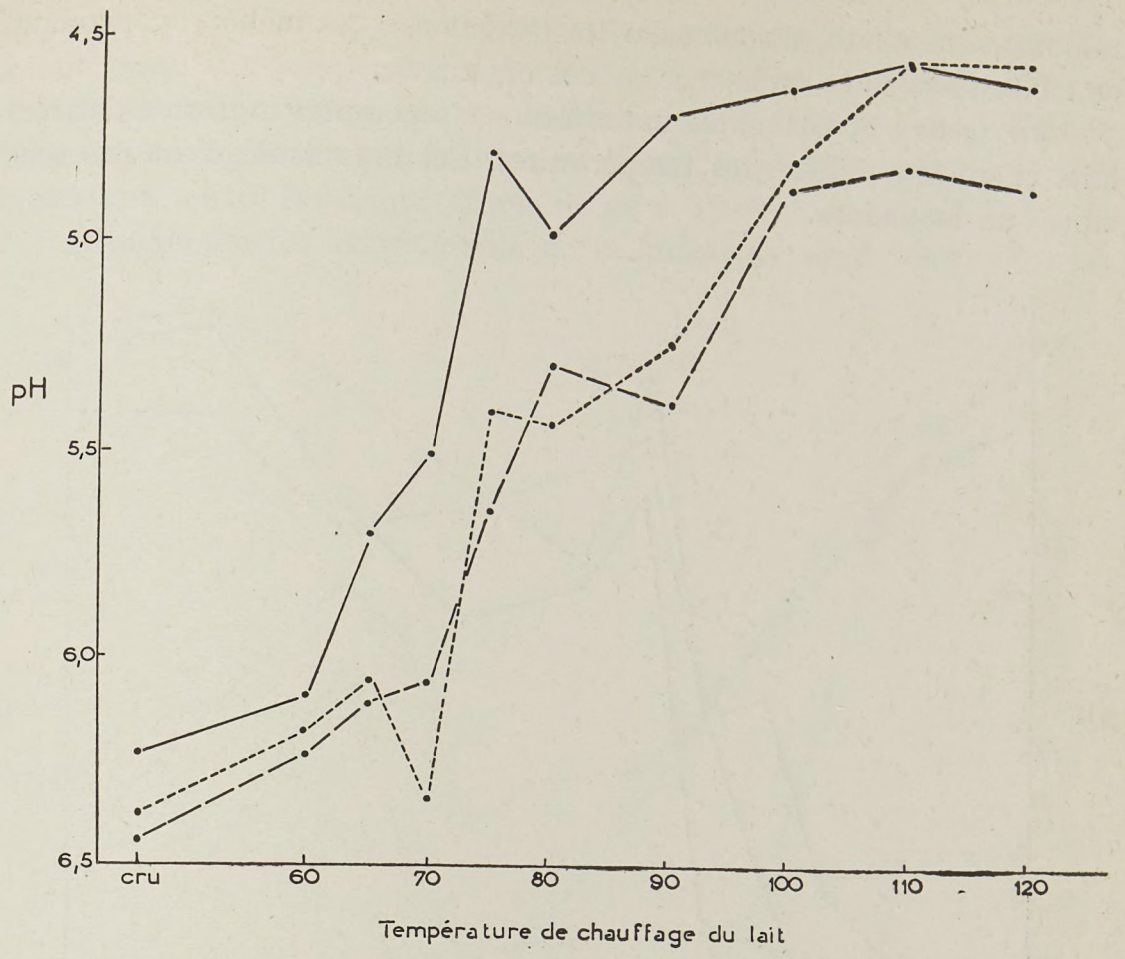


FIG. 2. — Croissance de *Streptococcus lactis* X 13 dans des laits chauffés à des températures variables.

——— Pâquerette (19-11-53)
— — — Cabale (3-6-54)
- - - - - - Cabale (17-6-54)
Ensemencement : $1/10^6$. Incubation : 18 heures à 30°.

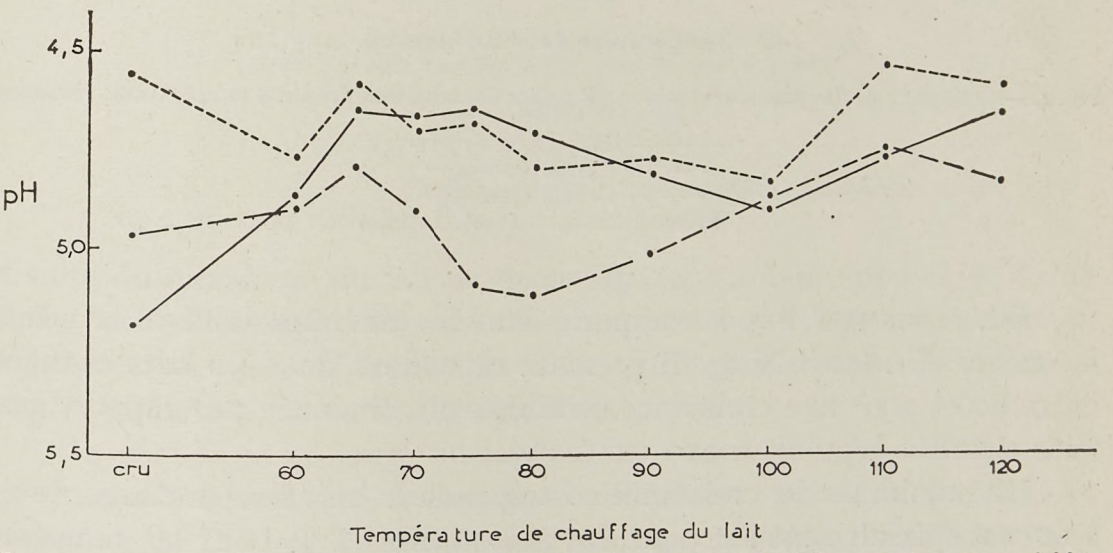


FIG. 3. — Croissance de *Streptococcus lactis* 7 M 10 dans des laits chauffés à des températures variables.

——— Pâquerette (19-11-53)
— — — Cabale (3-6-54)
- - - - - - Cabale (17-6-54)
Ensemencement : $1/10^4$. Incubation : 18 heures à 30°.

minutes, qui n'a aucun effet sur les lacténines (3), améliore cependant de façon sensible la croissance de cet organisme.

Str. lactis 7 M 10 montre une croissance à peu près uniforme dans les laits chauffés à différentes températures. Cet organisme n'est pas sensible aux lacténines.

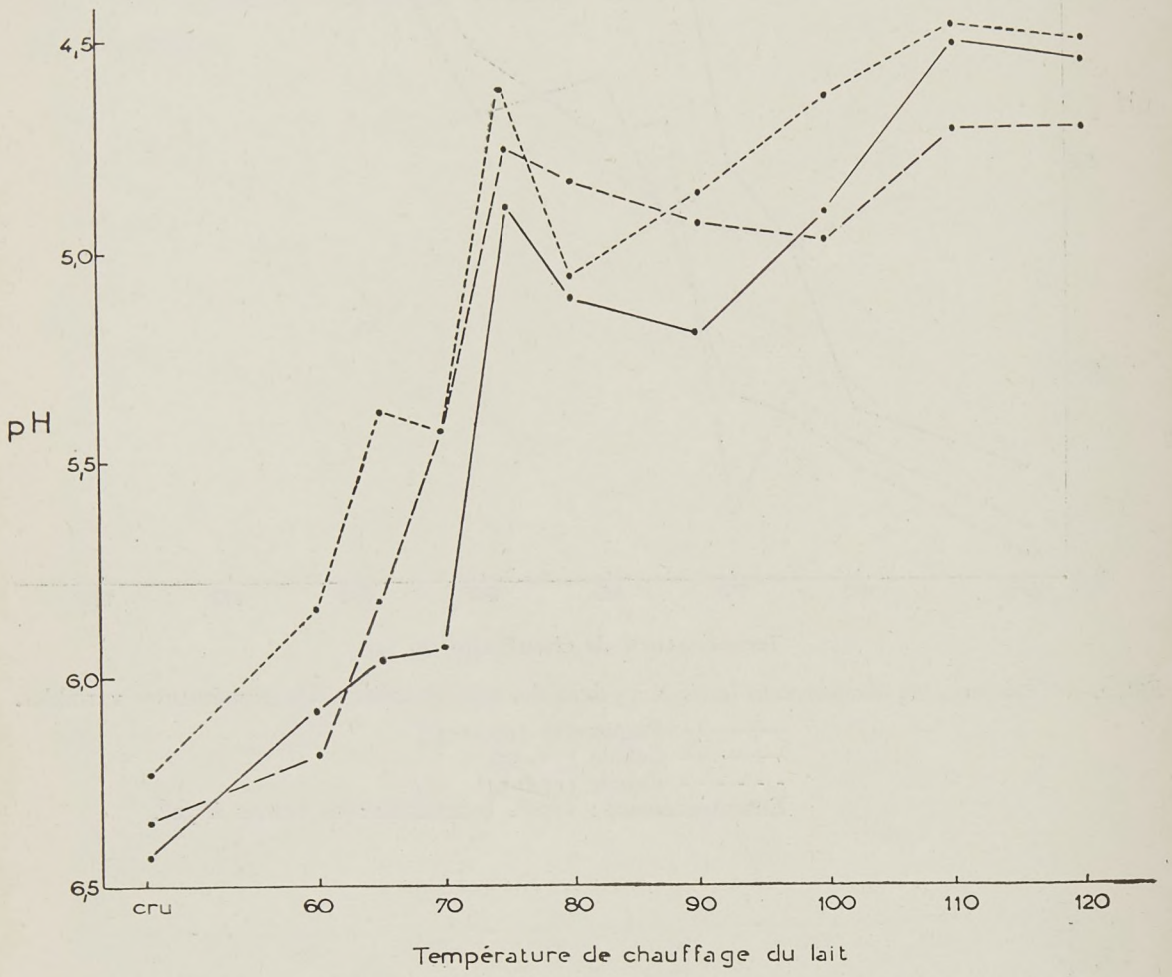


FIG. 4. — Croissance de *Streptococcus cremoris* 1 P 5 dans des laits chauffés à des températures variables.

——— Pâquerette (19-11-53)
— — — Cabale (3-6-54)
- - - - - - Cabale (17-6-54)
Ensemencement : $1/10^4$. Incubation : 18 heures à 30°.

Str. cremoris 1 P 5 se comporte dans les différents laits de la même façon que *Str. lactis* X 13. Il présente cependant dans les laits chauffés entre 80 et 100° une croissance sensiblement diminuée par rapport aux laits chauffés à 75° et à 110 ou 120°.

Un minimum de croissance correspondant aux températures de 75 à 90° est spécialement net pour *Str. thermophilus* T J. Pour les températures inférieures à 65° et supérieures à 90°, la croissance de cet organisme est améliorée par le chauffage du lait.

Les courbes obtenues avec *L. lactis* O 37 sont les plus complexes.

La croissance de cet organisme augmente légèrement lorsque l'on chauffe le lait jusqu'aux températures de 70 à 75°, puis brusquement entre 75 et 80°, en même temps que les lacténines sont détruites. Les courbes présentent ensuite un palier entre 80 et 90°, suivi d'une remontée très importante entre les températures de 90 à 110°.

L'augmentation considérable de la croissance de *L. lactis* O 37 à

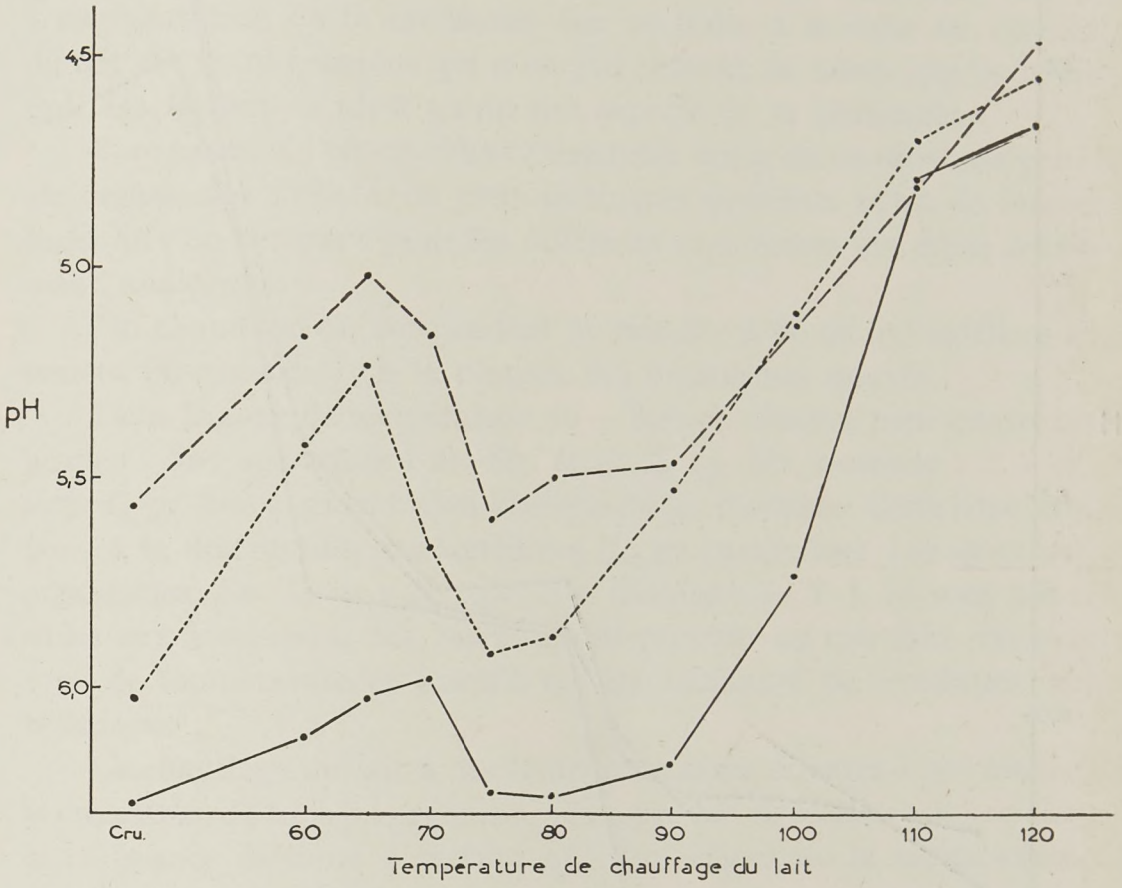


FIG. 5. — Croissance de *Streptococcus thermophilus* T J dans des laits chauffés à des températures variables.

——— Badou (21-9-54)
— — — Cabale (3-6-54)
- - - - - - Cabale (17-6-54)
Ensemencement : $1/10^6$. Incubation : 18 heures à 42°.

la suite du chauffage du lait au-dessus de 100° a déjà fait l'objet d'une étude particulière (13). Nous avons pu montrer que cette augmentation d'activité est due à la formation d'une substance stimulante formée à partir du lactose au cours du chauffage.

Un chauffage prolongé du lait à l'autoclave (plus de 20 minutes à 120°) accroît la quantité de substance stimulante formée. Cependant la croissance de *L. lactis* au lieu de s'en trouver améliorée, diminue au contraire par suite de l'intervention d'un facteur d'inhibition dont l'étude est en cours.

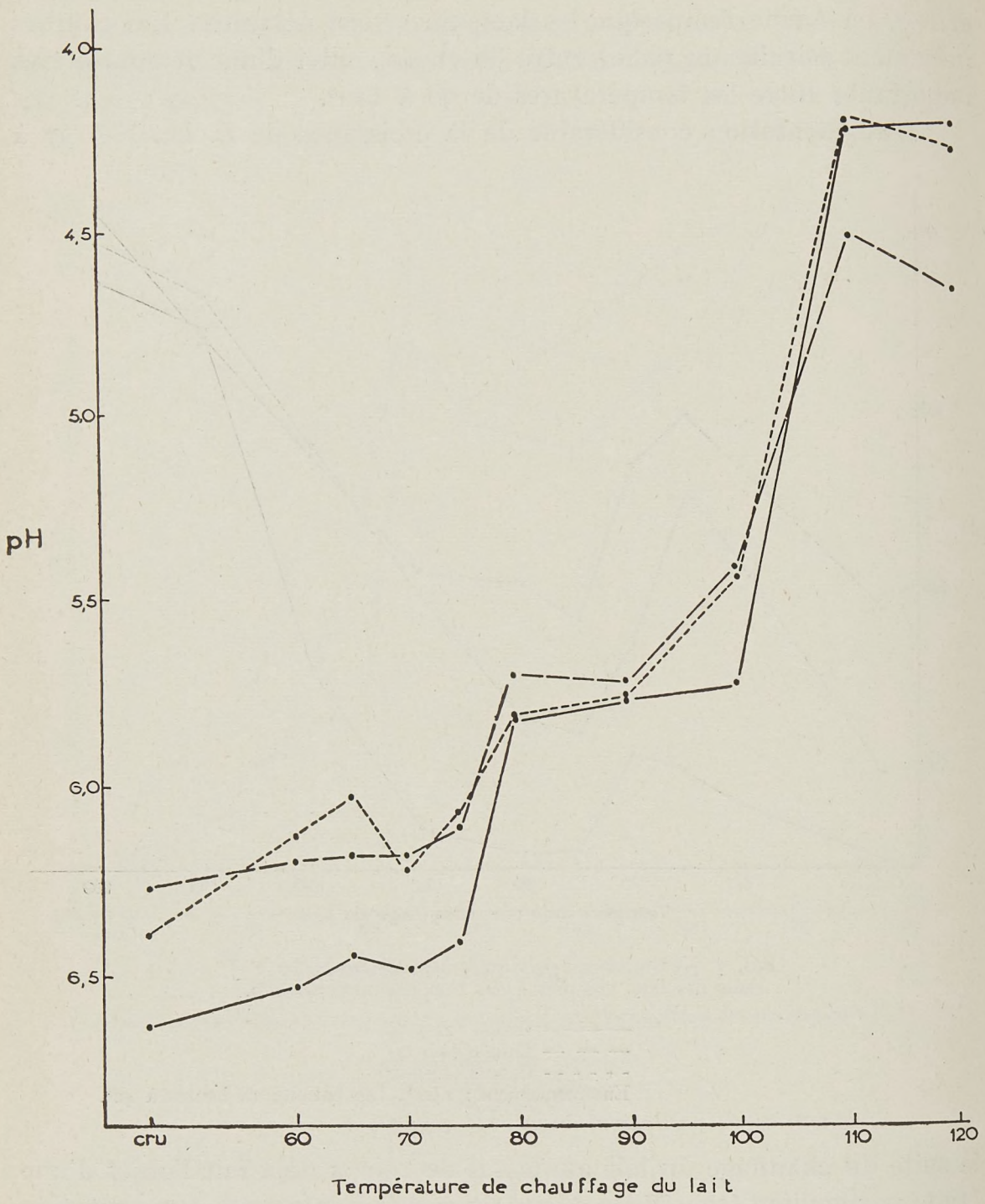


FIG. 6. — Croissance de *Lactobacillus lactis* O 37 dans des laits chauffés à des températures variables.

——— Pâquerette (19-11-53)
— — — Rose (7-12-53)
- - - - - - Tulipe (10-12-53)
Ensemencement : $1/10^6$. Incubation 18 heures à 42°.

DISCUSSION

Les résultats qui viennent d'être décrits montrent que le lait subit, par chauffage, des modifications dont les effets sur la croissance des bactéries sont essentiellement variables avec les organismes utilisés. L'augmentation de la croissance des bactéries à la suite du chauffage du lait est un phénomène qui n'est pas général, de même que la destruction des lacténines n'est qu'un des aspects de ce phénomène.

Cependant si l'on considère l'ensemble des courbes obtenues pour les six organismes utilisés, on peut distinguer plusieurs zones de températures où l'on retrouve pour les différents organismes des effets sensiblement analogues.

Un chauffage du lait pendant 20 minutes à 60 ou 65° améliore légèrement la croissance de la plupart des organismes essayés.

Dans la zone de température 70 — 80°, on observe pour quatre organismes : *Str. agalactiae* 1 B, *Str. lactis* X 13, *Str. cremoris* 1 P 5 et *L. lactis* O 37, une augmentation brusque de la croissance. Cette zone correspond à la destruction des lacténines (L_2 en particulier). Les deux autres organismes, *Str. lactis* 7 M 10 et *Str. thermophilus* T J, ne sont pas sensibles aux lacténines. *Str. thermophilus* présente au contraire dans cette zone de température et jusqu'à 90° un minimum de croissance caractéristique.

Le chauffage du lait à des températures supérieures à 90° augmente la croissance de tous les organismes excepté *Str. agalactiae* 1 B pour lequel la croissance diminue à mesure que l'on augmente la température de chauffage.

Dans leur ensemble ces résultats sont en bon accord avec ceux de Orla-Jensen et Jacobsen (4). Ces auteurs, utilisant des organismes appartenant aux mêmes espèces que les nôtres, mesuraient l'acidité titrable obtenue après incubation dans des laits chauffés à des températures variables. Les courbes que l'on peut construire à partir de leurs données ont la même allure que celles que nous venons de décrire.

Parmi les modifications que subit le lait au cours du chauffage, nous avons pu reconnaître d'une part la destruction des lacténines dans la zone de température 70-80°, d'autre part la formation entre 90 et 110° d'une substance stimulante active spécialement sur *L. lactis* O 37 (13). Il est évident d'après les courbes obtenues que d'autres phénomènes interviennent qui restent encore à élucider. Il est possible que l'augmentation de la teneur du lait en azote non protéique, de même que l'abaissement du potentiel d'oxydo-réduction du lait au cours du chauffage

favorisent le développement de certains microorganismes (10, 11). Cependant ces phénomènes ne semblent pas avoir une grande influence sur la croissance des organismes que nous avons étudiés ici. Nous n'avons pas pu confirmer non plus la présence dans le lait de substances bactéricides thermostables (4). Nous avons constaté par contre, comme les autres auteurs (4, 10, 11), une diminution très nette de la croissance de plusieurs bactéries à la suite du chauffage prolongé du lait à haute température (120° et au delà).

Enfin il est intéressant de remarquer que, si la croissance des microorganismes dans des laits de vaches individuelles peut, indépendamment de tout traitement thermique, présenter des différences sensibles d'un animal à un autre (14), l'influence du chauffage sur la croissance des bactéries est cependant prépondérante. Cette influence s'exerce toujours de la même manière quelle que soit l'origine du lait ; elle dépend avant tout des organismes utilisés, chaque souche bactérienne présentant une réponse caractéristique.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

(1) Auclair (J. E.) et Hirsch (A.). — The inhibition of micro-organisms by raw milk. I. The occurence of inhibitory and stimulatory phenomena. Methods of estimation. *J. Dairy Res.*, **20**, 45-59, 1953.

(2) Auclair (J. E.) et Berridge (N. J.). — The inhibition of micro-organisms by raw milk. II. The separation and electrophoretic examination of two different inhibitory fractions. *J. Dairy Res.*, **20**, 370-374, 1953.

(3) Auclair (J. E.). — The inhibition of micro-organisms by raw milk. III. Distribution and properties of two inhibitory substances, lactenin 1 and lactenin 2. *J. Dairy Res.*, **21**, 323-336, 1954.

(4) Orla-Jensen (S.) et Jacobsen (J.). — Neue Untersuchungen über die bakteriziden Eigenschaften der Milch. *Zbl. Bakt. Parasitenk.*, II Abt., **80**, 321-341, 1930.

(5) Ritter (P.). — Einfluss der Erwärmung von aseptisch ermolkener Rohmilch auf das Wachstum der wichtigsten Milchsäurebakterienarten und Esch. coli. *Landw. Jahrbuch der Schweiz*, **59**, 915-927, 1945.

(6) Bogdanoff (W. M.). — L'influence des différentes températures de pasteurisation du lait sur le développement des microbes acido-lactiques du type *Streptococcus lactis* et *Bacterium casei*. *Le lait*, **13**, 677-686, 1933.

(7) Singh (K.) et Laxminarayana (H.). — Studies on the growth of starter organisms in abnormal milk. *Indian J. Dairy Sci.*, **1**, 78-86, 1948.

(8) Czulak (J.) et Meanwell (. J.). — Seasonal variation in cheese starter activity. *Proc. Soc. appl. Bact.*, **14**, 1-6, 1951.

(9) Jago (G. R.). — Factors influencing the lactic acid-producing properties of streptococci used in the manufacture of cheddar cheese. I. Observations relating inhibitory and stimulatory phenomena. *J. Dairy Res.*, **21**, 111-121, 1954.

(10) Tyler (M. E.) et Weiser (H. H.). — Factors affecting Swiss cheese starter activity. Effect of heat-treatment and source of milk. *J. Dairy Sci.*, **25**, 939-948, 1942.

(11) FOSTER (E. M.). — The effect of heat on milk as a culture medium for lactic acid bacteria. *J. Dairy Sci.*, **35**, 988-997, 1952.

(12) AUCLAIR (J. E.). — Stimulation of certain bacteria by raw milk. *Nature*, **173**, 491, 1954.

(13) AUCLAIR (J. E.) et PORTMANN (A.). — Un facteur de croissance pour *Lactobacillus lactis* formé au cours du chauffage du lait à l'autoclave. *C. R. Acad. Sc.*, **238**, 2463-2465, 1954.

(14) RITTER (P.). — Die Disposition der Milch. *Landw. Jahrbuch der Schweiz*, **63**, 595-686, 1949.

ÉVOLUTION DU POTENTIEL D'OXYDO-RÉDUCTION AU COURS DE LA MATURATION DES RAISINS

PAR

Léonce DEIBNER

avec la collaboration technique de **Jules Mary** et de **Pierre Benard**

Station centrale de Recherches sur l'Œnologie, la Cidrerie et les Jus de Fruits, Narbonne

---

PLAN DU MÉMOIRE

I. — **Introduction.**

II. — **Protocole expérimental.**

III. — **Résultats.**

IV. — **Conclusions.**

V. — **Bibliographie.**

I. — Introduction

L'appréciation des phénomènes d'ordre biologique par une mesure physico-chimique est toujours intéressante par elle-même ; si elle permet en outre une meilleure interprétation des faits, elle devient extrêmement précieuse.

Les réactions d'oxydo-réduction jouent un rôle essentiel dans les organismes vivants. Leur étude peut être effectuée par les mesures des différences du potentiel, ce qui permet d'apprécier d'abord le niveau de réactivité électronique des substances prenant part dans les processus oxydo-réducteurs.

Ces considérations nous ont amené à étudier le potentiel d'oxydo-réduction au cours de la maturation du raisin.

Les recherches sur l'évolution de ce potentiel au cours de la maturation du raisin sont extrêmement rares. La première tentative de telles mesures a été faite, à notre connaissance, seulement en 1951-1952 par Berg (1). A cette occasion, douze cépages d'Asie Centrale Soviétique,

indigènes ou d'origine européenne ont été étudiés. La détermination du potentiel a été faite à l'aide du vase à électrode de KOTCHERGA (2), dont la description est reproduite dans notre publication parue en 1953 (3). Nous ne sommes renseignés ni sur la nature du gaz inert employé, ni sur les modalités des mesures potentiométriques. Or, il est extrêmement important, non seulement d'effectuer les mesures à l'abri de l'air, mais également d'obtenir les jus de raisin sans le moindre contact avec l'oxygène. Nous ignorons si ces conditions auraient été réalisées.

II. — Protocole expérimental et Technique

La mise au point d'un pressoir à filtre (4) et d'un dispositif à électrodes (5) nous a permis d'établir le mode opératoire rationnel, d'une part, pour libérer le jus des baies de raisin et, d'autre part, pour déterminer son potentiel d'oxydo-réduction, toujours dans l'atmosphère d'azote, ne possédant pas l'effet perturbateur comme le gaz carbonique.

Durant l'été de 1954, nous avons suivi l'évolution du potentiel au cours de la maturation des raisins rouges d'un vignoble de Razimbaud, situé tout près de Narbonne, sur la route nationale, en direction de Béziers. Les cépages expérimentés étaient ceux qui constituent la base de l'encépagement de la plaine du Narbonnais : l'Aramon et le Carignan, cépages de *Vitis-Vinifera*.

Les prélèvements de raisins ont été faits suivant la technique qui nous a paru la moins critiquable. On a opéré par temps ensoleillé, de préférence aux mêmes heures de la matinée, en prélevant quelques grappes de raisin, alternativement sur un nombre connu de ceps disposés en cercle autour d'un cep de repère ; on choisissait les grappes disposées sur le côté sud, en hauteur, plus près du tronc et du sarment. Les conditions de la cueillette, ainsi effectuée, ne correspondaient pas à celles d'un prélèvement rigoureux sur une centaine de ceps et de chaque côté de la rangée. Toutefois, pour les essais d'orientation, notre manière simplifiée d'opérer nous a paru suffisamment valable.

Les baies comptées, pesées, conservant les bourrelets de pédicelles, étaient écrasées et exprimées à l'aide de notre pressoir à filtre spécial, préalablement débarrassé de l'air et ensuite continuellement balayé par un courant d'azote pur, contenant de 0,002 p. 100 d'oxygène (Azote R de la Société « L'air Liquide »).

Pendant le pressurage la pression était de 4-5 kg par cm^2, la durée totale ds trois pressées-5 minutes.

Le jus, filtré sous pression du gaz à travers deux filtres en toile de coton préalablement lavée et séchée, était reçu dans le vase à électrodes, également rempli d'azote et parcouru par le courant de ce gaz pendant

les mesures potentiométriques. Les mesures du pH et du potentiel d'oxydo-réduction étaient exécutées à l'aide du potentiomètre des Établissements Quéré à Bordeaux. Le temps nécessaire pour que la vitesse de chute du potentiel soit devenue égale à environ 0,2 mV par minute, se situait en général entre 3 et 4 heures. Les potentiels, mesurés en présence de l'électrode au calomel saturé, étaient rapportés à l'électrode normale d'hydrogène. Les températures observées pendant les essais variaient entre + 18° et 29°C ; quant à la précision des mesures potentiométriques, elle est de 2,5-5 mV.

Au début on utilisait deux électrodes de platine, ensuite quatre et à la fin six, afin de diminuer les risques d'incertitude pendant les mesures. Nous exposerons dans un mémoire spécial les résultats de nos recherches sur la mise au point de la technique utilisée.

Une fois les mesures potentiométriques terminées, on dosait dans le jus l'acidité de titration, en présence du phénol-sulfonephtaléine, suivant la technique de Gille (6), le sucre suivant le procédé de Mohr-Bertrand, après la défécation au ferrocyanure de zinc suivant Jaulmes (7), conjointement avec le procédé réfractométrique.

Avant de présenter les résultats enregistrés, il faut souligner que les conditions climatiques de l'année 1954, ont été exceptionnelles. En effet, le déficit thermique et le déficit en ensoleillement étaient les plus considérables, qui aient été enregistrés depuis trente ans. Le retard de la floraison était de 15-20 jours pour le Midi ; la même constatation est valable pour la véraison et pour la maturité des raisins ; malgré cette circonstance, les vendanges ont été précoces dans beaucoup d'endroits.

Remarquons que le beau temps revenu a contribué à l'amélioration de la récolte. Néanmoins, la maturation des raisins a été accomplie dans des conditions anormales par rapport à la moyenne. Nous supposons que les résultats de nos mesures du potentiel correspondraient à ces anomalies.

D'autres essais, plus systématiques et plus rigoureux, seraient nécessaires pour contrôler les résultats obtenus.

Leur plan devrait également comprendre, d'une part, les recherches sur l'amélioration de l'agencement et du rendement de notre pressoir à filtre, et, d'autre part, l'étude des variations possibles des valeurs du potentiel en fonction des pressions utilisées pour libérer le jus.

III. — Résultats

1° Cépages de même époque et de même origine

Nous avons réuni dans les tableaux I et II les valeurs du potentiel d'oxydo-réduction trouvées conjointement à d'autres données analytiques.

Nous ne nous occuperons pas des modifications de ces dernières puisque leur évolution est bien connue.

Tableau I

Evolution du potentiel d'oxydo-réduction du Carignan de plaine (Narbonne) au cours de la maturation

Les sucres réducteurs sont exprimés en grammes par litre de jus ; l'acidité de titration en milliéquivalents par litre.
Le potentiel d'oxydo réduction est rapporté à l'électrode normale d'hydrogène.

Dates des prélèvements	Sucre	Acidité de titration	pH	Potentiel d'oxydo-réduction moyen en mV	Observations
2 août 1954 ...	13,0	497,9	2,58	388	
5 août	17,8	470	2,62	384	
19 août	82,0	387,7	2,50	431	Début de véraison
26 août	101,2	281,6	2,62	432	
3 septembre ...	137,0	249,0	2,83	361	
10 septembre ...	162,5	163,2	2,88	362	
23 septembre ...	185,8	116,3	3,12	350	Date de la cueillette

Tableau II

Evolution du potentiel d'oxydo-réduction de l'Aramon de plaine (Narbonne) au cours de la maturation

Dates des prélèvements	Sucre	Acidité de titration	pH	Potentiel d'oxydo-réduction moyen en mV	Observations
30 juillet 1954 ..	10,1	515,7	2,55	390	
5 août	30,0	480,8	2,62	362	
13 août	70,0	438,8	2,64	376	Début de véraison
18 août	79,6	381,6	2,64	435	
25 août	93,2	283,7	2,67	418	
2 septembre ...	106,7	193,9	2,78	—	Mesure non retenue
9 septembre ...	137,5	175,5	2,88	383	
22 septembre....	139,2	132,6	3,00	370	Vendange de la parcelle
28 septembre....	179,0	108,2	3,02	345	Une parcelle voisine

Il ressort de l'examen des résultats de ces tableaux que l'augmentation du potentiel est sensible au moment de la véraison, c'est-à-dire au moment de l'apparition des substances colorantes dans les pellicules des raisins, liée d'ailleurs à une accumulation rapide du sucre dans les baies. D'une façon générale, au moment de la véraison, la teneur en sucre est voisine 10 grammes par litre de jus ; par exemple, d'après Webster et Cros (8), la pigmentation du raisin Concord devient apparente pour les teneurs en sucre approximativement supérieures à 7 p. 100. Comme on

le sait, la véraison est caractérisée par une intensification des échanges chimiques, par une amplification des processus oxydo-réducteurs. Le potentiel suit ces phénomènes ; une fois son maximum atteint, il amorce son abaissement progressif. Nous n'avons pas pu le suivre jusqu'à la période de la surmaturation, les vendanges ayant été commencées trop tôt ; de sorte que pour l'Aramon nous étions amenés à continuer les essais sur les raisins d'une autre parcelle non encore vendangée.

La baisse du potentiel, comprise entre le maximum et le potentiel correspondant à 180 g de sucre par litre de jus, est de 79 mV pour le Carignan et de 90 mV pour l'Aramon. La différence entre ces deux cépages est petite et se trouve dans les limites des erreurs propres aux mesures potentiométriques. Dans les conditions de nos essais, ces deux cépages ne paraissent pas être différents au point de vue de l'évolution des potentiels d'oxydo-réduction. Avant la véraison, les valeurs du potentiel sont inférieures au maxima respectives, sauf la première valeur pour l'Aramon ; toutefois, il y aurait beaucoup de chances de la considérer comme aberrante.

2° Cépages d'origines différentes

Il nous a été possible de mesurer les potentiels des jus de raisins mûrs ou très mûrs tout de suite après leur cueillette, provenant de cépages de différentes origines. Voici les résultats (tableau III).

TABLEAU III

Potentiel d'oxydo-réduction de raisins mûrs ou surmuris de différents cépages et de diverses origines

Les sucres réducteurs sont exprimés en grammes par litre de jus ; l'acidité de titration en milliéquivalents par litre.

Le potentiel d'oxydo-réduction est rapporté à l'électrode normale d'hydrogène.

Date des prélèvements	Cépage	Époque de maturité d'après PULLIAT	Provenance (commune) Emplacement	Sucre	Acidité de titration	pH	Potentiel moyen en mV	Observations
Raisins rouges								
29 sept. 1954.	Aramon	3e hâtive	Ouveillan-Aude coteaux.	182	114,3	3,2	312	Très mûr
4 oct. 1954.	Morastel	3e	Coursan-Aude plaine.	163	134,7	3,17	310	
5 oct. 1954.	Carignan	3e	Ouveillan-Aude coteaux.	240	108,1	3,22	293	Très mûr
Raisins blancs								
6 oct. 1954.	Terret-Bourret	3e tardive	Ouveillan-Aude coteaux.	192	108,1	3,0	363	
11 oct. 1954.	Macabéo	3e	id.	225,6	57,9	3,33	320	
12 oct. 1954.	Grenache blanc	3e	id.	234,7	105,9	3,12	293	
13 oct. 1954.	Terret blanc	3e tardive	id.	184	95,9	3,15	336	

Au premier abord, il existerait au point de vue des valeurs du potentiel, une différence entre l'Aramon, cultivé dans la plaine et l'Aramon des coteaux. Le potentiel du jus de raisin de Carignan des coteaux est beaucoup plus bas par rapport à celui de Carignan de la plaine. D'aurte part, les cépages plus tardifs, comme le Terret-Bourret et le Terret blanc, sont caractérisés par les potentiels plus élevés par rapport aux cépages moins tardifs, appartenant à la même époque, comme le Macabéo et le Grenache blanc.

3° Comparaisons avec les travaux étrangers

Dans le tableau IV, nous avons réuni les résultats obtenus par BERG (*op. cit.* (1)) pour les raisins Pinot noir et Riesling. Si on les compare aux nôtres, on constate que l'évolution de leur potentiel pendant la maturation est caractérisée également par l'existence d'un maximum. D'après BERG, le potentiel du raisin des cépages tardifs (Mskhaly, Terbach) est inférieur à celui du raisin des cépages hâtifs, comme Riesling et Pinot noir, par exemple ; d'aurte part, pour ces derniers, vers la maturité, la baisse du potentiel est plus grande.

TABLEAU IV

Evolution du potentiel d'oxydo-réduction des raisins des cépages d'origine européenne cultivés en Asie Centrale d'après BERG (op. cit. (1))

Pinot noir				Riesling			
Dates de détermination	Sucre g/l	Potentiel en mV	pH	Dates de détermination	Sucre g/l	Potentiel en mV	pH
1/VII	8,6	400,3	3,4	19/VII	13,0	499,8	2,6
10/VII	34,0	493,8	—	26/VII	19,0	519,8	—
18/VII	89,0	484,3	—	2/VIII	106,0	514,8	—
24/VII	107,0	474,3	—	9/VIII	154,0	451,7	—
31/VII	136,0	410,8	—	16/VIII	201,0	381,8	3,2
6/VIII ...	160,0	350,8	—				
11/VIII ...	175,0	325,3	—				
18/VIII ...	182,0	325,0	3,8				

Nos essais concernaient deux cépages ayant la même époque de maturité, 3e époque, suivant les essais établis par V. PULLIAT (9) ; toutefois, l'Aramon est plus hâtif.

IV. — Conclusions

En définitive, on peut dire que les résultats enregistrés paraissent correspondre aux faits bien connus observés pendant l'évolution des différents cépages. En effet, on sait que les baies de ces divers cépages ne

se comportent pas, au cours de leur maturation, de la même façon, ce qui détermine à la maturité, les différences de composition de leurs jus.

Quant aux potentiels des jus des baies de raisins mesurés aux différentes périodes de leur évolution végétative, ils reflètent leurs particularités physiologiques, en indiquant en premier lieu le niveau énergétique des phénomènes oxydo-réducteurs.

Certes, les résultats obtenus ne sont pas encore en grand nombre et ne permettent pas de faire des conclusions pratiques. D'ailleurs, il n'y a rien d'étonnant en cela puisque rien n'a été publié en Europe concernant les mesures du potentiel d'oxydo-réduction au cours de la maturation du raisin.

La présente étude comble partiellement une lacune existante et mérite d'être poursuivie à titre de contribution à une meilleure connaissance de la physiologie de la vigne et du raisin.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

(1) Berg (V.). — Potentiel d'oxydo-réduction pendant le processus de la maturation du raisin. *Vinodélié i Vinogradavstvo, S. S. S. R.*, n° 8, 13, 1953.
(2) Kotcherga (P.). — Trav. Inst. Ind. Alim. de Krasnodar S. S. S. R., **6**, 4, 1949.
(3) Deibner (L.). — Quelques dispositifs spéciaux facilitant les mesures potentiométriques dans les vins à l'abri de l'air. *Ann. Fals., Fraudes*, **46**, n° 531-532, 111, 1953.
(4) Deibner (L.). — Pressoir à filtre de laboratoire pour l'extraction du jus de baies de raisin, à l'abri de l'air et à des pressions connues variables (*à paraître*).
(5) Deibner (L.). — Mesures du potentiel d'oxydo-réduction dans les jus de raisin et les vins. Dispositifs, techniques, résultats obtenus (*à paraître*).
(6) Gille (R.). — Méthode de dosage de l'acidité dans les milieux colorés, notamment dans les vins. *Ann. Fals. Fraudes*, **25**, janvier, 146, 1932.
(7) Jaulmes (P.). — Analyse des vins, 1951, 174, Montpellier, Poulain édit.
(8) Webster (J.), Cross (F.). — The uneven ripening of Concord grapes. Chemical and physiological studies. *Bull. Agr. Exp. Station*, Oklahoma, U. S. A., N° T-13, juin, 1942.
(9) Viala (P.), Vermorel (V.). — Ampélographie, 1910, **7**, 363, Paris, Masson édit.

OXYDATIONS ET RÉDUCTIONS EN CIDRERIE

PAR

R. CREFF et P. JACQUIN

Station de Recherches Pomologiques et Cidricoles, Rennes

PREMIER MÉMOIRE

PLAN DU MÉMOIRE

I. — Introduction.

II. — Importance et état actuel de la question.

1° Les maladies des cidres provoquées par l'oxydation
- *a*) La piqûre acétique
- *b*) La maladie du framboisé
- *c*) La casse oxydasique
- *d*) La casse ferrique
- *e*) Les troubles de pasteurisation

2° Généralités sur les phénomènes d'oxydo-réduction

3° Les systèmes oxydo-réducteurs des solutions glucidiques des vins et des bières.

4° Les systèmes oxydo-réducteurs des cidres, poirés, jus de pommes et concentrés de jus de pommes et de poires.

III. — Résultats préléminaires.

1° Etude des potentiels limites
- *a*) Mode opératoire
- *b*) Inertie de l'électrode de Platine
- *c*) Résultats
- *d*) Interprétation

2° Etude de quelques cidres en bouteilles et concentrés dilués
- *a*) Technique utilisée
- *b*) Résultats
- *c*) Interprétation

3° Etude d'un test dérivé de l'I. T. T. applicable en cidrerie.
- *a*) Technique utilisée en brasserie
- *b*) Application à la cidrerie
- *c*) Résultats
- *d*) Interprétation

IV. — Orientation des travaux

V. — Conclusions générales

I. — INTRODUCTION

En cidrerie, les praticiens ont remarqué depuis longtemps l'action néfaste de l'air sur les cidres. Bien avant qu'on ne parlât d'oxydo-réduction, tout cidrier, fermier ou industriel reconnaissait qu'il était nécessaire d'éviter d'aérer les cidres, après défécation et soutirage de leurs moûts, tant au cours de leur fermentation que de leur conservation.

Les maladies qui frappent le plus souvent les cidres et qui provoquent les plus gros dégâts doivent être attribuées à l'action de l'oxygène de l'air.

Pour démontrer l'importance qu'il convient d'attacher aux phénomènes d'oxydo-réduction, en cidrerie, rappelons brièvement les maladies provoquées par des phénomènes d'oxydation.

II. — IMPORTANCE ET ÉTAT ACTUEL DE LA QUESTION

1° LES MALADIES DES CIDRES PROVOQUÉES PAR L'OXYDATION.

a) La piqûre acétique

Nous n'insisterons pas sur l'acescence ou piqûre acétique, fermentation acétique classique qui, pratiquement ne se rencontre qu'en cidrerie paysanne où les fûts, trop souvent contaminés par les bactéries oxydantes, ne sont pas munis de bondes hydrauliques isolant le cidre du contact de l'air extérieur.

b) La maladie du framboisé

Cette maladie des cidres doux se caractérise par une production anormale d'éthanal, par action conjuguée des levures et des bactéries acétiques, communiquant une saveur et une odeur caractéristiques ainsi qu'un trouble laiteux colloïdal aux cidres qui en sont atteints.

Cette maladie se développe dans les cidres doux de densité comprise entre 1025 et 1035 du fait d'une aération subie lors d'une filtration, d'une centrifugation et même parfois d'un simple soutirage. Du fait de leur carence en matières azotées, la fermentation languissante de ces cidres doux parait incapable de compenser cet apport d'oxygène.

Nous avons constaté fréquemment cette maladie, en cidrerie paysanne également, dans les cidres doux de Fouesnant en particulier, où elle se développe quinze jours à trois semaines après la mise en bouteilles. Dans ce cas, l'aération se produit lors du tirage à la cannelle : pour remplir la bouteille, le cidre coulant en film le long de la paroi interne

de celle-ci, se désature de son acide carbonique et fixe partiellement l'oxygène de l'air.

En cidrerie industrielle, malgré des soutirages sous pression d'acide carbonique et des embouteillages à l'aide de tireuses isobarométriques, une fixation d'oxygène se produit parfois, déclenchant la prolifération des bactéries oxydantes et l'apparition de la maladie du framboisé, lors de la reprise en fermentation.

En effet, l'acide carbonique des obus livrés par le commerce n'est pas absolument pur et renferme parfois une quantité d'air non négligeable : dans ces conditions, il se produit un apport d'oxygène ainsi que l'a signalé DEUX (1).

Lors de la mise en bouteilles avec les tireuses isobarométriques, l'air de la bouteille est chassé, lors du remplissage, par un tube capillaire en relation, non pas avec l'air ambiant, mais avec le réservoir de charge de la tireuse. Ce dispositif imaginé pour éviter une dépression, présente l'inconvénient de provoquer une oxydation importante dans le réservoir de charge qui, après le remplissage de quelques centaines de bouteilles renferme une proportion d'air non négligeable.

Un système d'embouteillage isobarométrique nouvellement proposé en brasserie de bière permettrait d'éviter cette oxydation en rejetant l'air des bouteilles à l'extérieur, grâce à un jeu de soupapes, sans dépression notable.

c) **La casse oxydasique**

Cette casse, assez courante avec les cidres normands, se rencontre plus rarement chez les cidres bretons.

Elle se caractérise par une coloration noirâtre envahissant progressivement le cidre, de la surface vers le bas, lorsque celui-ci est laissé quelques instants en vidange dans une bouteille ou dans un verre.

Il se produit, dans ce cas, une suroxydation enzymatique des tannoïdes du cidre et notamment des polyphénols — non tanins, au contact de l'oxygène de l'air, une faible acidité de la boisson favorisant cette casse.

D'après SMOCK et NEUBERT (2), le système oxydasique de la pomme est constitué par des peroxydases et des polyphénolases, l'oxydation du jus de pommes devant être attribuée tout particulièrement à l'action de ces dernières, l'acide ascorbique jouant un rôle important dans le phénomène.

BOGDANSKI (3) a étudié, dans une thèse récente, le système redox des jus de pommes non fermentés, au point de vue enzymatique. Il considère que le principal système oxydo-réducteur d'un tel milieu, serait le système phénol $\leftrightarrows$ quinone, système réversible grâce à des oxydases et à une déshydrase, l'hydrogène étant fourni par un donateur qui dans ce cas, serait l'acide ascorbique.

Ce système parait devoir perdre de son importance dans les cidres fermentés, car il doit se détruire rapidement, les réactions mettant en jeu les déshydrases étant surtout intracellulaires. L'addition d'anhydride sulfureux qui agit comme antiseptique en inhibant l'action des oxydases et qui agit également comme réducteur en réduisant les composés oxydés, permet de prévenir ou de guérir cette casse qui déprécie les cidres. Il s'agit donc bien encore dans ce cas d'un phénomène d'oxydo-réduction.

d) La casse ferrique

Provoquée par l'oxydation instantanée du fer ferreux, introduit accidentellement dans un cidre, en fer ferrique, lors d'un simple tirage du cidre au contact de l'air et combinaison de ce fer trivalent aux tannoïdes de la pomme, cette casse communique une coloration noirâtre aux cidres qui en sont atteints.

Si l'on considère que le potentiel normal du système Fer ferreux → Fer ferrique est de 714 millivolts et est indépendant du pH, un cidre même aéré n'atteignant ainsi que nous le verrons dans le paragraphe suivant, que difficilement 400 millivolts, ne devrait donc renfermer que des quantités très faibles de fer ferrique. Or, l'expérience nous prouve le contraire, une oxydation même limitée, transformant rapidement le fer ferreux en fer ferrique.

En effet, ceci prouve que le système à considérer n'est pas le système $Fe^{++} \rightleftarrows Fe^{+++}$, de potentiel normal de 714 millivolts, mais : probablement (Complexe acides-alcool Fe^{++}) $\leftrightharpoons$ (Complexe acides-alcool Fe^{+++}) l'acide-alcool intervenant principalement dans les cidres étant l'acide malique auquel se superpose l'action de l'acide citrique dans les poirés.

Cette oxydation rapide du fer ferreux en fer ferrique nous indique que ce système n'est pas à négliger dans l'étude de l'oxydo-réduction des cidres et des poirés.

Nous avons d'ailleurs présenté la théorie de la formation de ces complexes relatifs à la casse ferrique dans un mémoire actuellement à l'impression (4).

e) Les troubles de pasteurisation

On a noté, dans la stabilisation des cidres doux par pasteurisation, la présence de troubles susceptibles d'avoir la même origine que ceux constatés dans les bières ayant subi le même traitement par la chaleur.

Les troubles de ces cidres pourraient être sans doute attribués à des combinaisons floculées de tannoïdes et d'acides aminés ou encore à des acides aminés dont les groupements sulfhydryles s'oxyderaient avec doublement des molécules $2\ R — SH \rightarrow R — S — S — R$, d'où grossissement des micelles.

Étant donné qu'il s'agit de quantités très minimes de matières, de l'ordre du milligramme, suffisantes pour provoquer un trouble colloïdal, le problème présente donc de grandes difficultés pour être résolu.

2° GÉNÉRALITÉS SUR LES PHÉNOMÈNES D'OXYDO-RÉDUCTION

On groupe sous le nom d'oxydation les fixations d'oxygène, les déshydrogénations et les échanges d'électrons avec augmentation de charge, les réductions étant les réactions inverses. Les électrons ne pouvant exister à l'état libre, à toute oxydation est liée une réduction qui fixe ces électrons. On conçoit dès lors que puisqu'il s'agit de transfert d'électrons, on puisse suivre, par voie électrique, l'évolution de ces réactions. Les résultats obtenus sont ramenés à l'électrode normale d'hydrogène dont le potentiel est nul par définition. Dans la pratique, on opère le plus souvent avec une électrode au calomel comme référence. La différence de potentiel entre cette électrode et celle à l'hydrogène normal est connue, elle ne dépend que de la température : elle est, par exemple, pour le cas d'une électrode au calomel au chlorure de potassium saturé de :

252,5 MV	à 15°
248,8 MV	à 20°
245,8 MV	à 25°.

Pour un système en équilibre, le potentiel ainsi mesuré est une constante, pour un pH donné.

Clark avait préconisé la notation en rH, assez analogue à la notation en pH pour les acidités. L'état redox du milieu est exprimé par comparaison à celui d'un milieu hypothétique, contenant en solution le système

$$H_2 \leftrightarrows 2H^+ + 2e.$$

Dans un tel milieu le pouvoir réducteur pourrait s'exprimer par la pression d'hydrogène, mais comme pour le pH on préfère poser :

$$rH = -\log (H_2)$$

le rH étant lié au potentiel, au pH et à la température par la formule

$$E_H = -0{,}0002\ T pH + 0{,}0001\ T rH$$

$$rH = \frac{E_H}{0{,}0001\ T} + 2pH$$

soit à 30°

$$rH = \frac{E_H}{0{,}0303} + 2pH$$

si l'on exprime le potentiel par rapport à l'électrode d'hydrogène en volts, ou

$$rH = \frac{E_H}{30{,}3} + 2pH$$

si on l'exprime en millivolts, en se rappelant que

$$E_H = E \text{ mesuré} + E_C$$

E_C étant la différence de potentiel entre l'électrode de calomel et l'électrode à hydrogène normal.

Pour rappeler l'hypothèse de base, WURMSER (5) utilise d'ailleurs les notations rH_2 et E_{H2} au lieu de rH et E_H

Il existe actuellement une polémique assez vive pour savoir s'il est préférable de maintenir cette notation ou de la remplacer par les notations simultanées potentiel et pH. Aussi, pour pouvoir comparer nos résultats à ceux obtenus dans des études différentes, nous utiliserons les deux notations, rH et le potentiel lié au pH.

Rappelons qu'il existe des méthodes colorimétriques de mesure du rH, et que c'est surtout dans ce domaine que cette notation présente son intérêt. Si un système est tel que l'on connaisse la variation de sa coloration en fonction du rapport $\frac{\text{partie réduite}}{\text{partie oxydée}}$ que l'on désigne par $\frac{\text{Red}}{\text{Ox}}$, donc du rH, sa présence dans le milieu nous donne directement le rH sans avoir recours à des mesures électriques. Il faut toutefois que la quantité de colorant introduite soit négligeable par rapport au milieu afin d'éviter toute perturbation dans l'équilibre établi. Les différents colorants usuels ayant été étudiés soigneusement, on peut, si on le préfère, transformer les résultats en potentiel, connaissant le pH du milieu.

Il existe actuellement deux grandes théories de l'oxydation dans les milieux physiologiques :

La théorie de WIELAND des accepteurs d'hydrogène, celle de WARBURG d'activation de l'oxygène.

Pour WIELAND, l'oxydation consiste en une déshydrogénation de la molécule :

$$DH_2 \rightarrow D + H_2 \qquad (1)$$

Puis l'hydrogène ainsi libéré réagit sur l'oxygène.

$$H_2 + O_2 \rightarrow H_2O_2 \qquad (2)$$

$$H_2O_2 \rightarrow H_2O + 1/2\ O_2 \nearrow. \qquad (3)$$

La réaction 3 s'effectuant grâce à une catalase qui décompose l'eau oxygénée. En fait une telle réaction de mobilisation de l'hydrogène est possible en l'absence d'oxygène, s'il existe dans le milieu un corps capable de fixer l'hydrogène. L'oxygène n'est qu'un accepteur d'hydrogène parmi les autres.

Pour WARBURG, le phénomène fondamental est l'activation de l'oxygène par les oligoéléments, le fer et le cuivre en particulier.

L'oxygène donne un composé ferrique activé qui réagit sur la matière organique en donnant un composé ferreux qui, par action d'une nouvelle quantité d'O moléculaire, donne à nouveau le composé ferrique.

Nous verrons que les principales conceptions des systèmes oxydo-réducteurs des boissons s'inspirent de l'une ou l'autre de ces théories.

3° LES SYSTÈMES OXYDO-RÉDUCTEURS DES SOLUTIONS GLUCIDIQUES, DES VINS ET DES BIÈRES

WURMSER (8) et son École s'inspirent de la théorie de WIELAND. WURMSER a montré l'existence dans les solutions de glucides de 2 systèmes oxydo-réducteurs :

G′ en petite quantité, réagissant rapidement, qu'il appelle redoxine, et G_1 en plus grande quantité, réagissant plus lentement, qu'il appelle réductone. Leurs spectres montrent l'existence de groupements énoliques. La redoxine, en particulier, serait assez semblable à l'acide ascorbique, dont les deux H des groupements énols sont doués d'une très grande mobilité.

GELOSO (6) a montré l'existence de ces deux systèmes dans le vin et, grâce à eux, il explique l'établissement d'un potentiel limite voisin de 10 ± 0,7 unités rH, vers lequel tendent les potentiels de tous les vins conservés à l'abri de l'air. On a reproché à GELOSO d'avoir effectué ses mesures à pH = 9. Peut-on en effet affirmer que les systèmes isolés en milieu alcalin soient exactement semblables à ceux existant au pH normal et n'en diffèrent que par leur activité ?

Nous reviendrons sur cette objection plus tard.

RIBEREAU-GAYON (7) s'inspire, lui, de la théorie de WARBURG. Pour lui, l'oxygène est activé par le fer et le cuivre. Il y ajoute sa théorie propre des oxydants intermédiaires : des constituants du vin forment des peroxydes qui réagissent sur d'autres constituants difficilement oxydables de façon irréversible.

$$R + O_2 \leftrightarrows RO_2$$
$$RO_2 + M \rightarrow MO_2 + R.$$

Cette hypothèse lui permet d'expliquer le fait expérimental indéniable de deux stades d'oxydation : une fixation rapide d'oxygène au moment de l'aération, puis une évolution lente du système.

RIBEREAU-GAYON et GENEVOIS (8) ont reconnu pour le fer un autre rôle catalytique : il se formerait, à partir de l'acide tartrique et par l'intermédiaire du ferri-tartrate, de l'acide dioxymaléique réducteur sous sa forme énolique :

$$CO_2H - CHOH - CHOH - CO_2H \xrightarrow{+\,O_2} CO_2H - CO - CHOH - CO_2H$$

acide dioxymaléique

$$\rightarrow CO_2H - \underset{\displaystyle OH}{\overset{|}{C}} = \underset{\displaystyle OH}{\overset{|}{C}} - CO_2H \xrightarrow{+\,O_2} CO_2H - CO - CO - CO_2H$$

forme énolique réductrice — acide dioxytartrique

On retrouve les groupements diénoliques de WURMSER et de GELOSO et les deux conceptions se rejoignent ici.

En brasserie, VAN LAER (9) démontre que la bière peut absorber jusqu'à 6 à 7 cc. d'oxygène qui se fixe sur les tanins, résines, matières azotées de façon plus ou moins réversible. Il ne s'agit donc pas de véritables systèmes d'oxydo-réduction.

POUR HARTONG (10), GRAY, STONE et ROTSCHILD (11) le principal système redox des bières serait un complexe tanins-protéines, mais ils reconnaissent l'existence de systèmes mélanoïdines et réductones qui auraient de nombreuses analogies avec les systèmes G′ et G_1 de WURMSER.

ENDERS, THEIS et HEGENFORDER (12) accordent une certaine importance au système cystéine-cystine et au glutathion.

DE CLERCK (13) reconnait lui aussi leur importance et tend à y voir un facteur des troubles colloïdaux des bières.

URION et CHAPRON (14) classent les réducteurs en brasserie dans l'ordre suivant : acide ascorbique, réductone, cystéine et glutathion, tanins.

La complexité du système oxydo-réducteur fait que les chercheurs se sont orientés en brasserie vers le dosage du pouvoir réducteur total, les principales méthodes utilisant le 2-6 dichlorophénol-indophénol qui, grâce à son rH = 22, est décoloré par les systèmes redox courants et présente l'avantage d'être insensible à l'oxygène moléculaire.

Selon GRAY et STONE le concept d'un potentiel mesurable nécessiterait un système redox tel que les réactions soient réversibles, le milieu fortement oxytamponné et en équilibre, conditions très éloignées de la réalité.

Cette notion d'irréversibilité partielle est particulièrement importante. WURMSER et N. MAYER (15) remarquent que les 2 courbes en S obtenues, la première en oxydant au ferricyanure des solutions de glucides, la seconde en réduisant par le trichlorure de titane, ont des paliers inégaux, le système n'est pas entièrement réversible. Ceci est d'ailleurs confirmé par les travaux de GELOSO (6) qui note une légère augmentation du potentiel limite après chaque aération et une disparition progressive des systèmes G′ et G_1 quand on multiplie les aérations. En brasserie, des travaux récents mettent aussi en évidence une diminution du pouvoir réducteur du système en fonction de l'aération et un décalage du potentiel limite. FLANZY (16) note dans les vins une dégénérescence du système redox avec le temps.

Même pour des systèmes totalement réversibles, il faudrait tenir compte des vitesses relatives d'oxydation et de réduction. Ainsi l'acide ascorbique s'oxyde en moins de 15 secondes dans les boissons en donnant de l'acide déhydroascorbique. Or cet acide déhydroascorbique, aux potentiels existant dans de tels milieux, ne se réduit en acide ascorbique qu'au

bout de temps bien plus long. Il est admis pratiquement en brasserie que l'acide ascorbique est un réducteur et non un tampon d'oxydo-réduction, la bière étant consommée dans un temps relativement court après sa fabrication. L'existence de ces systèmes irréversibles ou pseudo-réversibles n'est pas à négliger ; nous verrons qu'elle semble avoir une certaine importance en cidrerie.

4° LES SYSTÈMES OXYDO-RÉDUCTEURS DES CIDRES, JUS DE POMMES, POIRÉS, ET CONCENTRÉS DE JUS DE POMMES ET DE POIRES

On peut à la lueur de ces travaux envisager l'existence dans les cidres et surtout dans les cidres encore doux, de systèmes voisins de G′ et G_1 de WURMSER : G′ pouvant être en partie de l'acide ascorbique qu'on trouve en quantité intéressante dans le jus de pommes. L'acidité de la pomme étant constituée pratiquement par l'acide malique, nous pensons pouvoir éliminer le système de l'acide dioxymaléique qui doit ses propriétés à l'existence de groupements diénoliques, alors que l'acide malique ne donne par oxydation qu'une seule fonction énol.

On ne peut négliger à priori un système tanins-protéines rappelant celui de la bière, le cidre contenant à côté des tannoïdes une certaine quantité de matières azotées, des acides aminés principalement.

Enfin, bien que BOGDANSKY (3) n'ait pas trouvé de cystéine dans les jus non fermentés, on ne peut éliminer les systèmes cystine-cystéine et glutathion qui peuvent être apportés par les levure au cours de la fermentation. De CLERCK (13) leur donne une importance considérable dans les troubles de la bière et ses conclusions pourraient être valables pour ceux des cidres.

BOGDANSKI (3) donne beaucoup d'importance à un système diphénol-quinone réversible grâce à des oxydases, une déshydrase et à l'acide ascorbique qu'il schématise ainsi :

$$\text{o. diphénol} + \text{oxydase} + O_2 \rightarrow \text{quinone} + H_2O$$

$$\text{quinone} + \text{déshydrase} + \text{acide ascorbique} \rightarrow \text{o. diphénol} + \text{acide déhydroascorbique}$$

Ce système doit devenir irréversible dans le cidre, soit par disparition de l'acide ascorbique ou plutôt par celle de la déshydrase dont les réactions sont liées aux cellules.

La pulpe de pomme brunit à l'air par oxydation des polyphénols et tanins. La pulpe cuvée à l'abri, bien tassée, se décolore au centre.

Mais le jus obtenu par pressurage reste coloré et ne se décolore plus. Il semble donc que le système ait perdu sa réversibilité.

Il est curieux de constater l'utilisation en laiterie comme antioxygène de gallate d'éthyle (17). Il pourrait exister dans les cidres en petites quantités des composés analogues, résultant de la réaction des acides polyphénoliques sur l'alcool, dont l'action n'est peut-être pas négligeable.

On utilise aussi le citrate de soude qui aurait une action synergiste sur l'activité de nombreux oxydants (18). Les poirés contenant des quantités assez importantes d'acide citrique, et l'addition d'acide citrique étant autorisée dans les cidres jusqu'à 500 mg. au litre, cette action mérite d'être étudiée dans le cas qui nous intéresse.

La plupart des concentrés de moûts de pommes utilisés pour l'édulcoration des cidres secs, sont obtenus par évaporation partielle sous vide, par la chaleur. Ces conditions favorisent la formation de réductones et de mélanoïdines auxquelles on attribue le goût de cuit, mais qui ont des propriétés réductrices notables. L'étude de ces systèmes ne doit pas non plus être négligée.

Il ne faut pas oublier qu'il est courant en cidrerie, d'utiliser l'anhydride sulfureux ou le métabisulfite de potasse. Les propriétés réductrices de l'anhydride sont connues depuis longtemps, il serait bon d'étudier son rôle aux doses légales, au point de vue oxydo-réduction.

Enfin comme nous l'avons déjà vu il existe dans le cidre un système redox dû au fer, non pas à l'équilibre ionique

$$Fe^{++} \leftrightarrows Fe^{+++}$$

comme on l'a cru longtemps, mais plus vraisemblablement à l'équilibre complexes ferreux- complexes ferriques, des acides malique et citrique.

III. — RÉSULTATS PRÉLIMINAIRES

Les travaux effectués jusqu'ici comportent : des mesures de potentiel, une adaptation de l'I.T.T. (indicator time test) aux cidres, une étude de la variation du potentiel en fonction de l'addition de 2.6. dichlorophénol-indophénol. Nous avons travaillé sur des cidres de variétés sélectionnées en fermentation dans des bonbonnes, des cidres de variétés sélectionnées conservés en bouteilles depuis deux ans, deux cidres commerciaux capsulés par des capsules différentes, des poirés conservés en bouteilles, des concentrés industriels de moûts de poires et de pommes, dilués ou non.

Les résultats obtenus sont encore provisoires, car dans bien des cas nous en sommes encore aux hypothèses, mais quelques travaux, notamment ceux de H. Rentschler et H. Tanner (21), ayant été publiés récemment, il nous a paru intéressant d'y comparer nos résultats.

1° ÉTUDES DES POTENTIELS LIMITES

a) Mode opératoire

Nous avons mesuré le potentiel au potentiomètre à l'électrode de platine brillant par rapport à une électrode au calomel, à chlorure de potassium saturé. Pour cette 1re série de mesures, nous avons opéré dans les bonbonnes où s'effectue la fermentation des cidres. Le cidre y est maintenu à l'abri de l'air sous une légère surpression, grâce à des tubes de sûreté renfermant une solution sulfureuse, qui le protège à la fois contre les contaminations du milieu extérieur, et contre l'oxydation. Il suffit en effet d'une très légère fermentation pour maintenir la légère surpression en CO_2 et empêcher les rentrées d'air.

b) Inertie de l'électrode de Platine

Lors de nos différentes mesures, nous avons été frappés par l'inertie d'une telle électrode qui conserve longtemps l'influence du milieu d'où elle provient. Nous avons tourné la difficulté, dans le cas qui nous intéresse, en prenant les potentiels à intervalles réguliers, jusqu'à ce que la différence entre deux mesures soit négligeable.

Les cidres de la campagne 1952-53 ayant une fermentation languissante qui maintient le pouvoir réducteur, le cidre étant saturé de gaz carbonique, la surface de contact avec l'air au moment de la pose des électrodes étant très petite, l'oxydation par la surface ne peut se faire sentir de façon appréciable sur un volume de 20 à 25 litres. Comme nos électrodes plongent dans le liquide de 25 cm environ, l'oxydation à cette profondeur est négligeable.

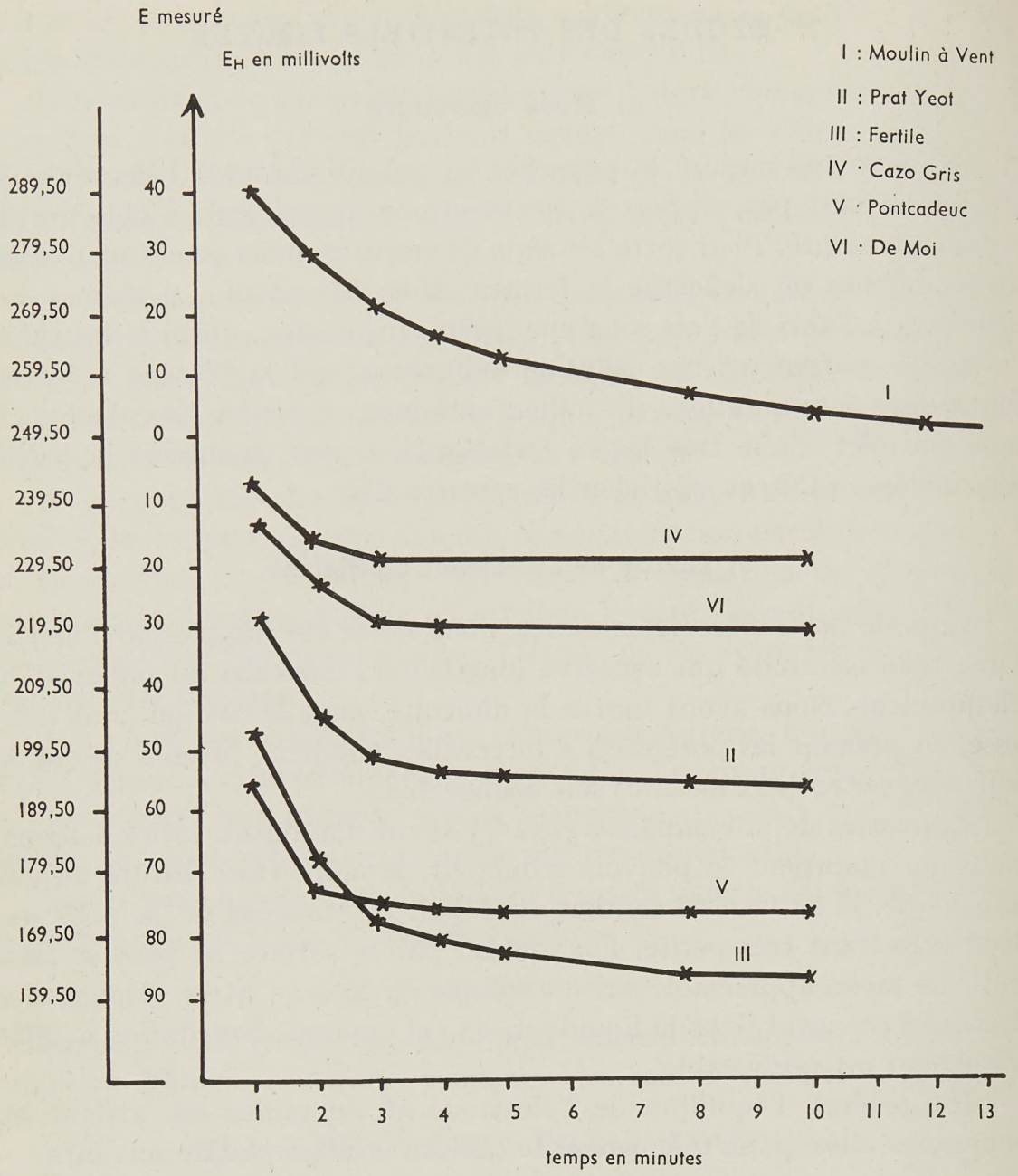
En général, l'équilibre de l'électrode et du milieu est atteint en 10 minutes ainsi qu'en témoignent le tableau et le graphique suivants :

TABLEAU I

Temps d'équilibre de l'électrode de Platine. — Potentiel en millivolts

Variété	1′	2′	3′	4′	5′	8′	10′	12′	14′
De Moi	— 12	— 24	— 29	— 30	— 31	— 32	— 32		
Pontcadeuc	— 55	— 72	— 76	— 76	— 76	— 77	— 77		
Cazo Gris	— 6	— 16	— 19	— 20	— 20	— 20	— 20		
Fertile	— 47	— 69	— 77	— 81	— 84	— 86	— 87		
Prat Yeot	— 28	— 44	— 51	— 53	— 55	— 56	— 56		
Moulin à Vent	+ 40	+ 30	+ 22	+ 17	+ 14	+ 7	+ 4	+ 2	+ 2

Tous nos calculs ont été effectués avec ce dernier chiffre, (potentiel après 10 minutes), l'équilibre se maintenant au moins 10 minutes.



GRAPHIQUE I. — Équilibre de l'électrode de platine.

c) **Résultats**

Nous avons utilisé à la fois le rH et le potentiel en tenant compte du pH. Nous n'ignorons pas les reproches faits à la notion du rH mais dans le cas spécial qui nous préoccupe elle nous parait assez intéressante.

En effet la comparaison entre les potentiels n'est pas parlante puisque les pH varient de 3, 00 à 4,0 et plus. Les cidres étant des milieux très tamponnés, il faudrait leur ajouter de fortes quantités d'acides ou de bases pour les ramener à un pH commun, et on ne connaît pas l'influence d'une telle addition sur les systèmes redox naturels.

La série de mesures ayant été effectuée dans une cave où la tempé-

rature ne varie guère de plus de 1°, à 18/19°, nous avons calculé le rH par la formule

$$rH = \frac{E_H}{29,2} + 2pH$$

ou E_H = potentiel en mV par rapport à l'électrode d'H en millivolts et E_H = E mesuré + 249, 5 mV.

d) Interprétation

On note donc des variations très notables qui ne paraissent pas devoir s'expliquer par des différences de composition : il ne semble pas y avoir de relation, par exemple, entre la teneur en tanins et le rH. « Coquerelle » a une teneur en tanins de 0,64 g. au litre et un rH de 14,70 tandis que « Stang Ru » qui contient 9,10 g de tanins par litre, a un rH de 14,90. Il convient de remarquer que ces chiffres sont obtenus par la méthode de Lœwenthal qui donne en bloc tanins vrais, polyphénols et matières colorantes, dont les systèmes oxydo-réducteurs n'ont pas, à priori, les mêmes rH.

TABLEAU II

Potentiel mesuré dans des bonbonnes

Variétés	Potentiel mesuré	E_H	pH	rH
Blanc Mollet	— 141	108,50	4,08	11,90
Reine des Hâtives	— 88	161,50	3,50	12,50
Douce Glaz	— 101	148,50	3,85	12,70
Barrière	— 84	165,50	3,55	12,75
Penn Chopine	— 72	177,50	3,40	12,80
Avalou Beleien	— 103	146,50	4,03	13,05
Tesnières	— 53	196,50	3,30	13,30
Variété Lemarié	— 81	168,50	3,85	13,45
Fertile	— 87	162,50	4,0	13,50
Doux Coursier	— 84	165,50	3,93	13,50
Joly Rouge	— 92	157,50	4,15	13,65
Egyptia	— 71	178,50	3,80	13,70
Cazo Gris	— 20	229,50	3,0	13,80
Doux Crasseux	— 65	184,50	3,77	13,80
Petit Rouget	— 76	173,50	4,0	13,90
Pontcadeuc	— 77	172,50	4,0	13,90
De Moi	— 33	216,50	3,27	13,95
Prat Yeot	— 56	193,50	3,70	14,0
Petit Gilet Rouge de Janzé	— 15	234,50	3,0	14,0
Variété Cadudal	— 71	178,50	4,0	14,10
Joly de Beuzeville	— 73	176,50	4,12	14,25
Grise Dieppois	— 62	187,50	3,93	14,30
Petit Doux	— 79	170,50	4,30	14,40
Fréquin Rouge	— 40	209,50	3,70	14,50
Doux Lalouet	— 42	207,50	3,70	14,50
Noël des Champs	— 51	198,50	3,93	14,55
Groin d'Ane	— 55	194,50	3,95	14,60
Petite Amère de Bray	— 35	214,50	3,65	14,70
Coquerelle	— 2	247,50	3,15	14,70
Jaune de Vitré	— 6	243,50	3,25	14,80
Stang Ru	— 28	221,50	3,70	14,90
Moulin à Vent	— 0	249,50	3,65	15,30
Solage à Gouet	— 13	236,50	3,80	15,60
Cidre n° 1 de deux ans sec	+ 4	253,50	3,75	16,10
Cidre n° 2 amer	— 40	209,50	3,95	15,10

Ces cidres provenant de variétés sélectionnées en étude à la Station ont été suivis pendant toute l'année et leur densité relevée tous les mois. Nous avons fait figurer dans le tableau III, à côté du rH trouvé pour chaque variété, la chute de densité depuis la fabrication et la chute de densité durant le mois précédant la mesure du potentiel. Le premier chiffre nous renseigne sur l'activité moyenne de la fermentation, le second sur son activité au moment des mesures. On peut admettre que le pouvoir réducteur du milieu en fermentation est fonction de cette activité, bien que les cidres fermentant avec leurs levures naturelles il puisse y avoir des levures plus ou moins réductrices. Ceci étant admis on constate que :

— Les cidres à rH bas ont une fermentation active et fermentent toujours activement au moment des mesures.

TABLEAU III

Activité de la fermentation et rH

Variétés	rH	Chute totale	Dernier mois	Variétés	rH	Chute totale	Dernier mois
Moulin à Vent	15,30	15	1	Reine des Hâtives	12,50	35	4
Solage à Gouet	15,60	14	2	Blanc Mollet	11,90	34	3
Doux Lalouet	14,50	11	2	Barrière	12,75	39	2
Fréquin Rouge	14,80	18	3	Douce Glaz	12,70	37	2
Coquerelle	14,70	20	3	Penn Chopine	12,80	36	3
Stang Ru	14,90	9	2	Tesnières	13,30	45	3
Groin d'Ane	14,60	22	2	Joly Rouge	13,65	39	4
Noël des Champs	14,55	13	3	Variété Lemarié	13,45	38	4
Joly Beuzeville	14,25	24	3	Jaune de Vitré	14,80	61	1
Petite Amère de Bray.	14,70	22	2	Doux Coursier	13,50	44	2
Cidre n° 1 sec	16,10	(entièrement		Doux Crasseux	13,80	21	5
Cidre n° 2 sec	15,10	fermenté depuis 1 an)		Avalou Beleien	13,05	17	4

— Les cidres à rH élevé ont fermenté lentement et la fermentation était languissante au moment de la mesure.

La variété « Jaune de Vitré » a fermenté très activement, mais la fermentation est stoppée depuis deux mois. La petite quantité d'oxygène introduite au moment de la prise mensuelle des densités n'a pu être compensée par le pouvoir réducteur du milieu en fermentation.

La variété « Doux Coursier » bien qu'ayant fermenté très activement a un rH relativement élevé, mais la fermentation est totalement terminée, puisque ce cidre a une densité de 1001. L'oxydation consécutive aux prises de densité et à la mesure du potentiel, n'étant plus compensée, le rH augmente de façon importante.

Les cidres n° 1 et 2 de deux ans, complètement fermentés subissent un début d'oxydation d'où leur potentiel élevé.

Inversement les cidres des variétés « Avalou Beleïen » et « Doux Crasseux » bien que fermentant lentement ont un rH assez bas, car on

note un accroissement de l'activité de la fermentation au cours du dernier mois, qui a permis l'élimination rapide de l'oxygène introduit.

Il y a cependant des exceptions, ce qui ne peut surprendre si l'on considère d'une part la grande variété des pommes à cidre étudiées qui vont de la pomme aigre à la pomme douce, de la pomme très amère, riche en tanins à la pomme douce pauvre en tanins et d'autre part la diversité des levures de cidres, puisque dans la pratique courante, la fermentation est assurée par les levures naturelles du milieu, très différentes les unes des autres.

Les résultats obtenus montrent que les cidres tendent vers un potentiel limite voisin de rH 12, qui pourrait correspondre au système mis en évidence par WURMSER (5) dans les solutions de glucides et par GELOSO (6) dans les vins à un rH voisin de 11 ± 0,7 unités rH, ce système étant le système G_1 des glucides réagissant lentement. On remarque d'autre part la prédominance de rH voisins de 14/15 qui correspondraient au système G' réagissant plus rapidement, le potentiel s'établissant dans cette zone par suite des oxydations consécutives aux prises de densité.

Ces quelques résultats permettent d'autre part d'insister sur l'extrême sensibilité des cidres puisqu'une simple aération par une surface très réduite, lors des prises de densité, suffit à faire remonter le rH de 3 unités. Il semble d'autre part que la fermentation des cidres beaucoup plus languissante que celle des vins ne suffit pas à ramener le potentiel à sa limite inférieure, ce qui se constate surtout sur les cidres naturellement doux avec lesquels on cherche intentionnellement à réaliser une fermentation très lente. Il y a une part d'oxydation pratiquement irréversible dans de tels cidres si l'on considère la lenteur de la fermentation et le fait que les cidres sont consommés dans l'année de leur fabrication.

2° ÉTUDE DE QUELQUES CIDRES EN BOUTEILLES ET DE CONCENTRÉS DILUÉS

a) Technique utilisée

GELOSO (6) a étudié le système oxydo-réducteur des vins en établissant la variation du potentiel par addition goutte à goutte d'un oxydant. En opérant très rapidement, il met en évidence le système agissant rapidement et en opérant plus lentement, le système lent plus important. Nous avons pour notre part établi des courbes analogues sur des cidres en oxydant à l'aide d'une solution de 2-6 dichlorophénol-indophénol.

Ces déterminations ont été réalisées sur des cidres en bouteilles conservés pendant deux ans, qui devraient donc avoir atteint leur potentiel

limite. On pouvait espérer à priori, étant donné le pouvoir oxydant de l'indophénol, négliger l'action de l'air au moment de la mesure à condition de pouvoir prendre les potentiels très rapidement. Malheureusement étant donnée l'inertie de l'électrode de platine, cette oxydation par l'air n'est plus négligeable. Pour éviter cet inconvénient nous opérons donc actuellement sous atmosphère de gaz inerte. Le gaz carbonique étant le gaz naturel des cidres nous l'avons choisi, bien qu'il ait l'inconvénient d'être rarement pur. En opérant sous atmosphère de gaz inerte on peut attendre l'équilibre de l'électrode.

Pour les courbes rapides donnant les systèmes agissant plus rapidement, nous envisageons actuellement de remplacer l'électrode de platine par une électrode à gouttes de mercure, dans l'espoir d'atteindre plus rapidement le potentiel d'équilibre du système étudié. Alors que l'électrode de platine ne peut nous donner qu'une composante de plusieurs systèmes, notamment si ceux-ci ont des potentiels normaux très voisins, l'électrode à gouttes de mercure devrait nous permettre la séparation de ces systèmes, par l'établissement de paliers propres à chacun d'eux.

Nous essayons aussi d'établir ces courbes après réduction à l'hydrosulfite. On obtient ainsi l'ensemble des systèmes réducteurs contenus dans le cidre. Certains de ces systèmes ne doivent jouer qu'un rôle négligeable, étant pratiquement irréversibles dans les conditions industrielles si l'on considère que les cidres sont consommés très rapidement dans l'année suivant la fabrication et le plus souvent deux ou trois mois après la mise en bouteilles.

Malgré leur insuffisance, nos premières déterminations potentiométriques des systèmes redox à l'aide d'un oxydant permettent de tirer quelques conclusions.

b) **Résultats**

Nous avons opéré sur 10 cc de boisson provenant de la bouteille immédiatement après son ouverture. Avant l'addition de l'oxydant, nous avons attendu que le potentiel s'équilibre. On trouve dans le tableau suivant ces potentiels d'équilibre.

TABLEAU IV

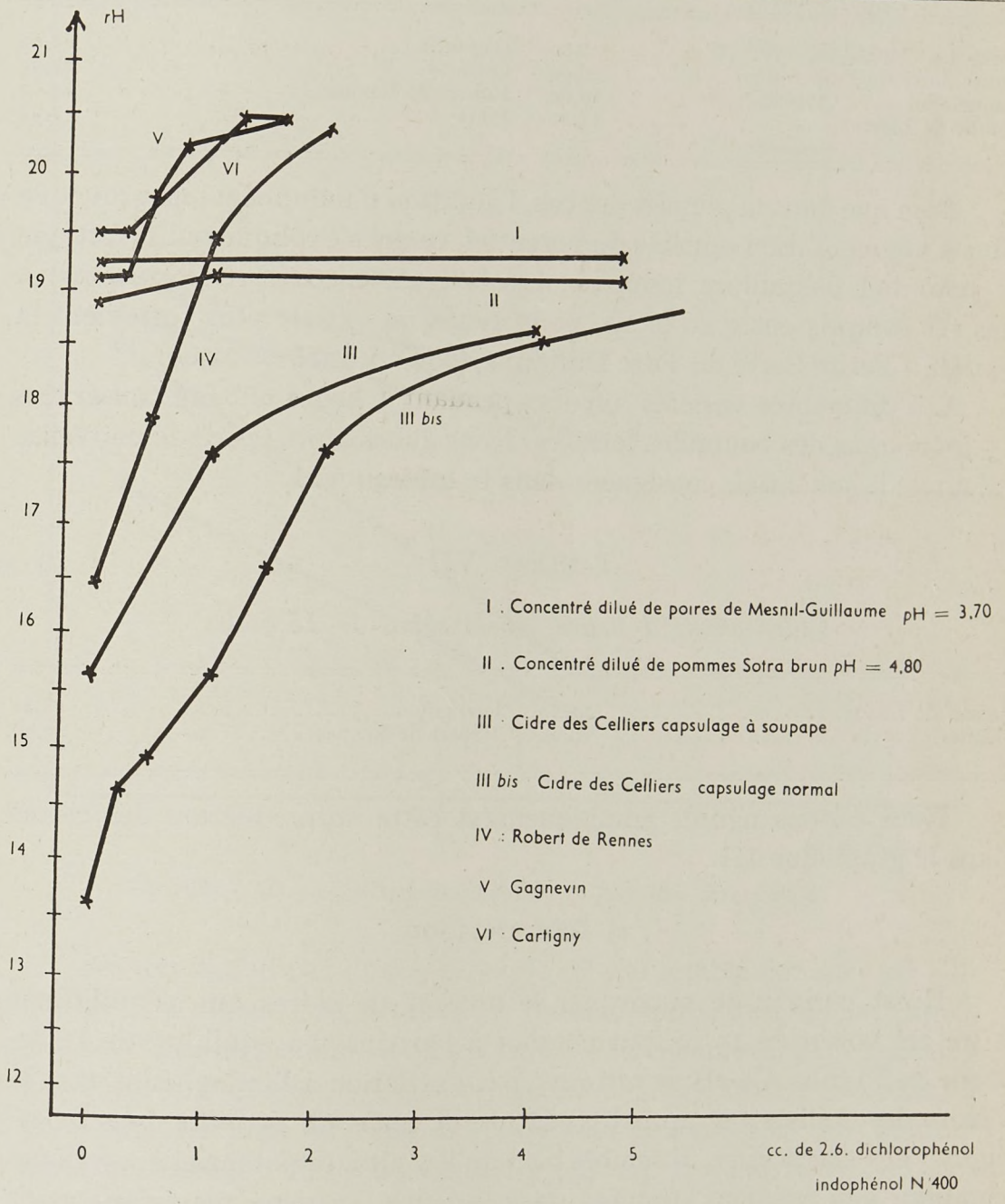
rH d'équilibre au contact de l'air

Cidre des Celliers à capsule couronne..	13,40	Cartigny	19,50
Cidre des Celliers à capsule à soupape.	15,60	Robert de Rennes.....	16,40
Petite Sorte du Parc Dufour	19,20	Poiré.....	16,50
Panneterie.....	19,00	Concentré Sotra brun dilué.....	19,40
Jambe de Lièvre	18,40	Concentré de poires dilué	19,30
Gagnevin.....	19,20		

Tableau V

après oxydation par l'indophénol

Cidre des Celliers	19,20	Gagnevin	20,35
Petite Sorte du Parc Dufour	20,00	Cartigny	20,50
Panneterie	20,00	Poiré	20,10
Jambe de Lièvre	20,10		



Graphique II. — Courbes de variation du rH en fonction de l'addition de 2,6. dichlorophénol-indophénol.

Nous avons représenté graphiquement quelques-unes des courbes obtenues dans le graphique II.

Nous avons oxydé ces différents cidres par barbotage d'air pendant une heure, l'air arrivant à l'aide d'un tube capillaire dans une fiole à vide où une certaine dépression était maintenue par une trompe à eau. Les résultats sont consignés dans le tableau VI.

TABLEAU VI

rH après oxydation d'une heure

Cidre des Celliers	20,00	Gagnevin	20,60
Petite Sorte du Parc Dufour	20,00	Cartigny	21,50
Panneterie	20,00	Robert de Rennes	21,60
Jambe de Lièvre	21,80	Poiré	21,90

Bien que dans la plupart des cas, l'addition d'indophénol ne provoque plus d'augmentation sensible du potentiel, ce qui s'explique par le fait que le potentiel d'équilibre indophénol coloré $\rightleftarrows$ leucodérivé correspond à des rH compris entre 20 et 22, nous avons pu oxyder plus fortement la variété « Petite Sorte du Parc Dufour » jusqu'à un rH = 21,60.

Ces différentes variétés oxydées pendant 1 heure ont été conservées 15 jours dans des bouteilles fermées. Nous avons alors opéré de nouvelles mesures de potentiel, consignées dans le tableau VII.

TABLEAU VII

Cidre oxydé 1 heure, après repos de 15 jours

Jambe de Lièvre	21,20	Cartigny	19,40
Gagnevin	19,20	Robert de Rennes	20,90

Nous faisons figurer graphiquement cette autoréduction des cidres dans le graphique III.

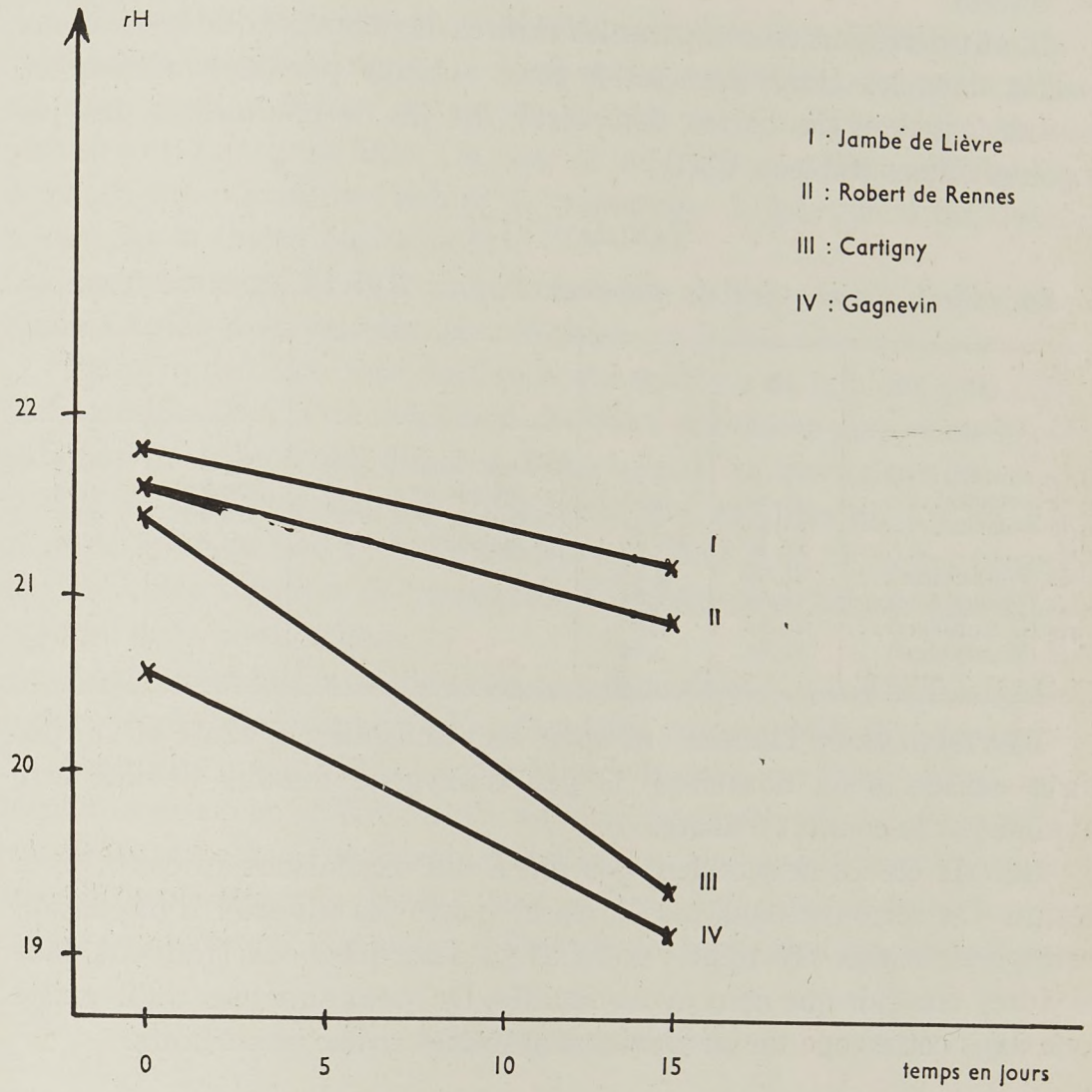
c) **Interprétation**

Il est curieux de remarquer le nombre de cidres qui s'équilibrent à un rH voisin de 19,20, par contact à l'air jusqu'à équilibre de l'électrode de Platine. Ce rH se retrouve par oxydation à l'indophénol dans le « cidre des Celliers » et après oxydation et repos de 15 jours dans « Cartigny » et « Gagnevin ». Il semble bien qu'il y ait à ce potentiel un système commun aux boissons dérivées de la pomme, système réagissant assez rapidement puisqu'il prédomine après un contact de quelques minutes à l'air, sans agitation.

Ce système semble devenu très important après chauffage, car le palier d'oxydation par l'indophénol devient très grand dans les concen-

trés, où il paraît être le système dominant, que nous retrouverons par les courbes d'I.T.T.

On retrouve au tableau IV un rH de 13, 40 qui correspond sensiblement au système G' des glucides à l'abri de l'air.



GRAPHIQUE III. — Réduction au bout de 15 jours des cidres oxydés.

Après oxydation par l'indophénol, le rH qui semble dominer est voisin de 20. Il y a peut être là un autre système, qui se retrouverait après oxydation d'une heure dans « Panneterie », « Petite Sorte du Parc Dufour » et le « Cidre des Celliers ». Nous avons rarement poursuivi l'oxydation par l'indophénol plus loin que ce palier, car se superpose au potentiel du système redox du cidre le potentiel propre du système :

indophénol coloré $\rightleftarrows$ leuco-dérivé.

Il semble qu'il existe aussi un système compris entre 21,5 et 22 qui pourrait être d'ailleurs le même que le précédent mais presque entièrement oxydé. Dans ce cas il s'agirait d'un système rapide dans le sens de

l'oxydation et plus lent dans le sens de la réduction, si l'on en juge par la vitesse de réduction des cidres suroxydés laissés au repos.

Nous nous efforçons d'identifier ces systèmes ainsi d'ailleurs que ceux à potentiel normal plus bas, que nous n'avons pas obtenu par suite de l'oxydation.

Il est intéressant de comparer les chiffres de potentiel que nous avons obtenus dans les cidres français à ceux obtenus par RENTSCHLER et TANNER (21) dans des cidres, des poirés, des jus de pommes et des jus de poires suisses (tableau VIII).

TABLEAU VIII

rH des cidres, poirés, jus de pommes d'après RENTSCHLER et TANNER

	rH	pH		rH	pH
Jus de poires	16	3,40	Mélange cidre et poiré..	19,20	3,46
Jus de pommes	20,80	3,17	Jus malade n° 1	20,80	4,05
Jus de pommes	21,40	3,32	Jus malade n° 2	22,20	3,87
Cidre	19,20	3,36	Jus malade n° 3	23,80	3,60
Poirés (Wasserbirne)....	19,80	3,85			
Poirés (Theilerbirne)....	20,60	3,85			
Poirés (Ottenbacher) ...	19,80	3,80			
Poirés (Marxenbirne) ...	19,80	3,82			

RENTSCHLER et TANNER ont opéré en atmosphère d'azote et sur des cidres conservés en bouteilles, le peu d'oxygène dissous devant être entraîné par le courant d'azote.

Les rH élevés ne semblent pas dûs à des oxydations au cours de la mesure. On retrouve dans ces cidres et poirés les niveaux d'oxydation correspondant aux rH 19,20 ; 20 et 21,50 à 22 que nous trouvons dans les cidres français que nous avons étudiés. On peut supposer qu'il existe donc dans cette zone un ou plusieurs systèmes redox importants.

3° ÉTUDE D'UN TEST DÉRIVÉ DE L'I.T.T. APPLICABLE EN CIDRERIE

a) Technique utilisée en brasserie

GRAY et STONE (19) estiment que les mesures de potentiel sont illusoires, car la bière ne constitue pas un système entièrement réversible, dont l'équilibre n'est atteint qu'au bout d'un temps très long. Ils préfèrent mesurer indirectement la concentration des substances réductrices. Ils mesurent pour cela la vitesse de réduction d'un indicateur convenable. Ils ont choisi le 2.6 dichlorophénol-indophénol sous forme de son sel de soude qui présente l'avantage, grâce à son potentiel élevé d'être insensible à l'action de l'air, tous les constituants de la bière susceptibles d'être

oxydés à l'air, se comportant comme des réducteurs vis-à-vis de l'indophénol.

HARTONG (10) avait lui aussi utilisé une méthode analogue.

De CLERCK (20) expose la méthode telle qu'elle est actuellement codifiée, dans son Cours de Brasserie :

On mesure le temps de décoloration en secondes de 80 % de l'indicateur plus facile à saisir que la décoloration complète. La solution utilisée est une solution N/200 du sel de sodium du 2.6 dichlorophénol-indophénol soit 1,45 g au litre. On dose la solution en milieu sulfurique par déplacement d'iode de l'iodure de potassium. L'iode libéré est dosé en retour par le thiosulfate N/100.

La mesure de l'I.T.T. proprement dite s'effectue dans des tubes calibrés à l'aide d'un comparateur Walpole.

Dans un tube on introduit 10 cc du moût ou de la bière, puis 0,25cc de la solution N/200 d'indophénol. Derrière ce tube on place dans le comparateur un tube d'eau distillée. Dans l'autre compartiment du comparateur, 10 cc d'une solution tamponnée aux environs du pH du moût ou de la bière, plus 0,25 cc de l'indicateur dilué à 20 %, soit à N/1000 ; derrière cette solution de comparaison on place un tube contenant du moût ou de la bière témoin.

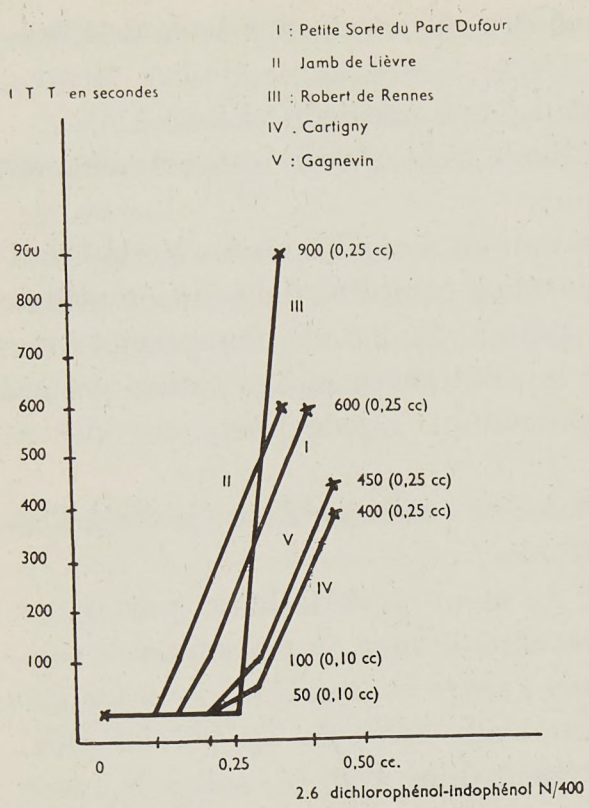
Au moment où l'on mélange les 10 cc de moût et 0,25 cc d'indi cateur, on déclenche un chronomètre. On l'arrête quand on atteint l'égalité des teintes.

On utilise une solution tampon pour le témoin, car l'indophénol s'il se décolore à un rH de 22 vire du bleu au rouge suivant le pH. L'influence de la température n'est pas négligeable : De CLERCK (20) conseille pour les mesures précises de placer le tube à essai dans un bain réglé à 20° et de ne le placer dans le comparateur que lorsque l'identité des teintes est presque atteinte.

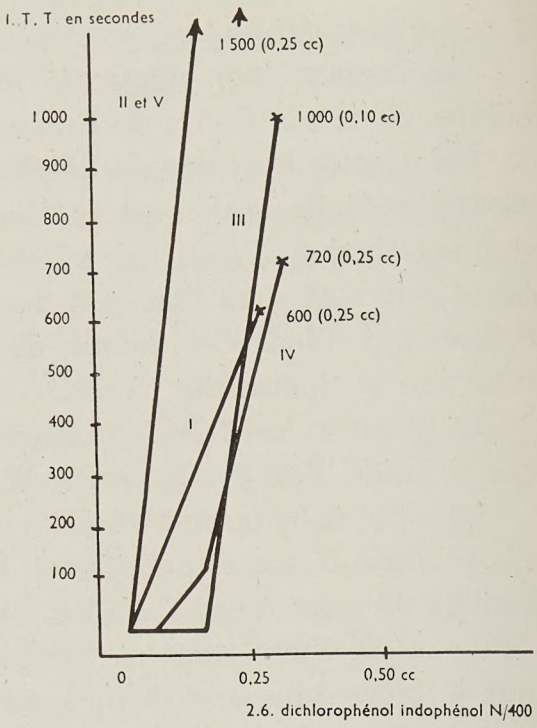
b) **Application en cidrerie**

Nous avons essayé d'appliquer l'I.T.T. à la cidrerie, mais nous nous sommes heurté à une première difficulté. Pour tous les cidres étudiés, l'I.T.T. était sensiblement nul. C'est qu'il existe dans presque tous les cidres une quantité de substances réductrices, réagissant rapidement qui décolorent immédiatement l'indophénol. Nous avons donc modifié la méthode en ajoutant goutte à goutte l'indicateur tant qu'il y a décoloration immédiate. Quand la couleur se maintient et atteint l'égalité de teinte avec le témoin nous versons la quantité prévue d'indicateur.

En fait nous opérons avec 3 doses d'indophénol : 0,10 cc, 0,25 cc et 0,50 cc ce qui nous donne trois temps différents. Pour faciliter l'interprétation nous traduisons tous ces résultats sur un graphique. Le palier traduit la quantité de réducteurs réagissant rapidement, la courbe est fonction des réducteurs plus lents.

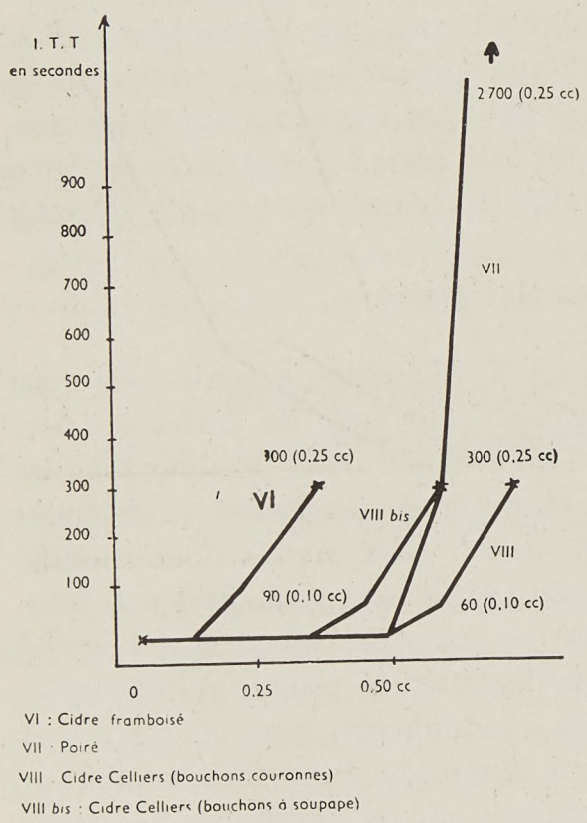


Cidres en bouteilles

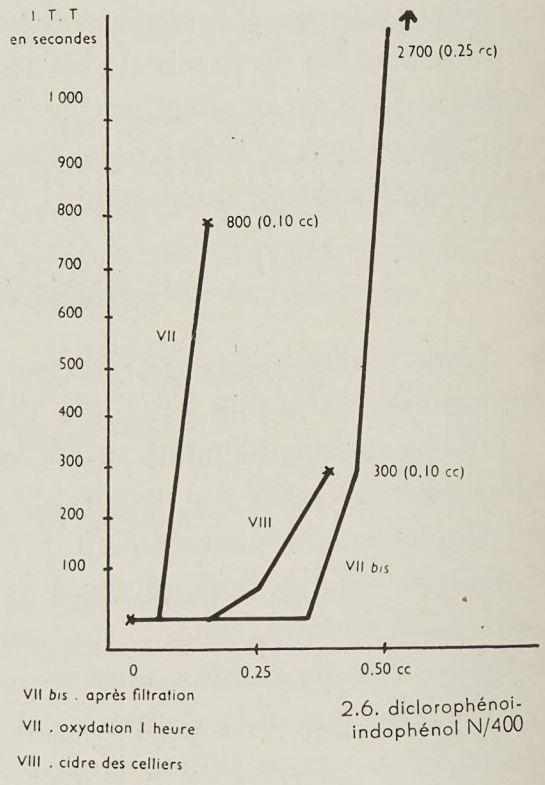


Après oxydation

GRAPHIQUE IV



Avant oxydation



Après oxydation

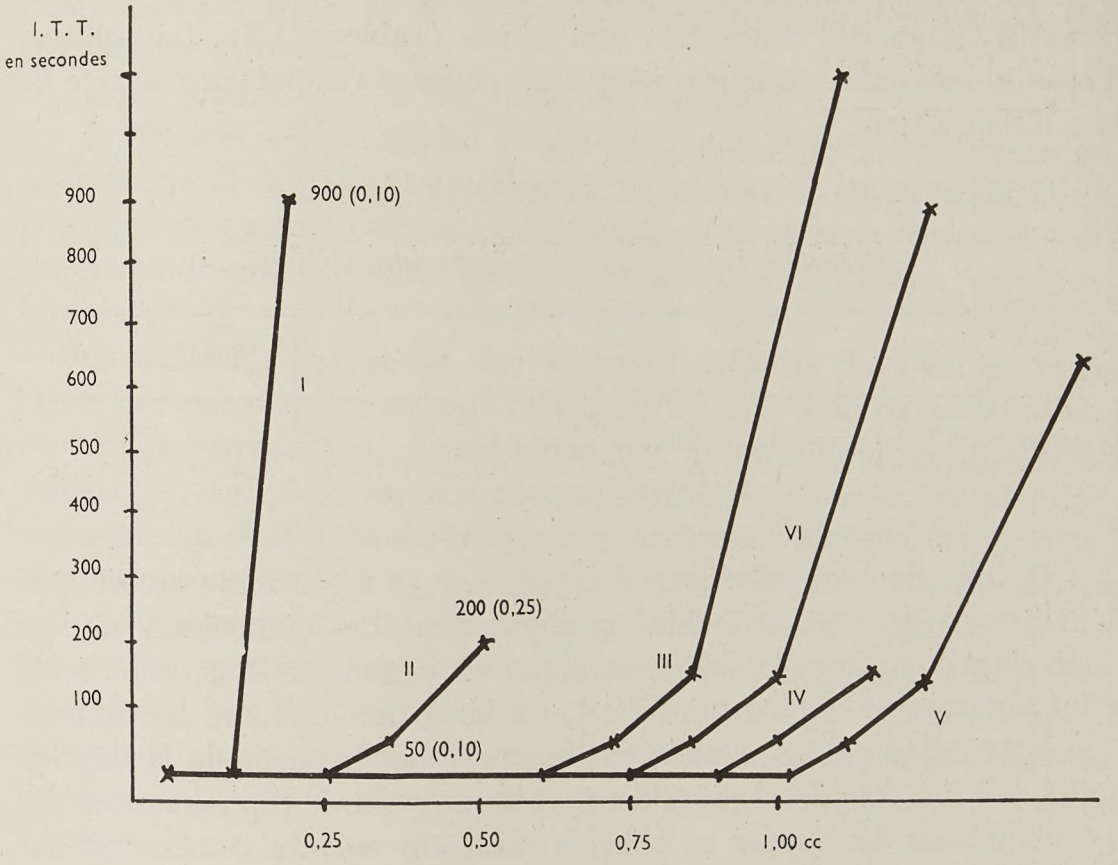
GRAPHIQUE V

Pour des raisons matérielles nous opérons sur 5 cc (au lieu de 10) avec une solution N/400 au lieu de N/200. Les résultats sont d'ailleurs comparables.

Nous utilisons pour le témoin une solution tampon à pH = 3,95, la différence de coloration n'étant guère sensible de 3,60 à 4,0. Pour les concentrés de pH élevé nous utilisons le tampon de Sörensen de pH 4,80 au citrate. En effet, de 4,0 à 4,3 la coloration vire rapidement du rouge au bleu et il faut en tenir compte.

c) **Résultats**

Les résultats de ce test adapté à la cidrerie se traduisent donc par un graphique caractérisant chaque cidre, poiré ou concentré. Se reporter aux graphiques IV, V et VI.



2.6. dichlorophénol-indophénol N/400

N° I : Concentré Sotra Super désacidifié détanisé sur résines, pH = 4,80

N° II : Concentré Sotra blond pH = 4,80

N° III : Concentré Sodra brun pH = 4,80

N° IV : Concentré APLO 38° B. pH = 3,80

N° V : Concentré de poires 38° B. de Mesnil-Guillaume

N° VI : Concentré de poires 38° B pH = 3,70

GRAPHIQUE VI

d) **Interprétation**

Le palier correspond à la quantité d'indophénol réduit immédiatement, donc aux systèmes réagissant très rapidement. Nous pensions au début qu'il correspondait à l'acide ascorbique, mais le développement de ce palier dans le cas des concentrés dilués à la densité d'un moût semble montrer qu'il correspond en même temps à des produits prenant naissance par l'action de la chaleur. Nous essaierons de déterminer la nature des constituants de ce palier.

On remarque que l'oxydation d'une heure porte principalement sur ce palier. Les systèmes apparaissant après addition de 0,10 cc. et 0,25 cc. d'indophénol étant à peine touchés.

Il est bon d'insister sur le pouvoir réducteur relativement élevé de la plupart des concentrés qui apparaît à la fois sur les courbes et par le potentiel limite des concentrés non dilués (Tableau IX). La solution diluée du concentré de poires n° 5 a un palier correspondant à 1 cc de la solution N/400.

TABLEAU IX

Potentiel limite des concentrés non dilués

	pH	rH
Concentré Sotra blond 37-38° B	3,20	12,05
Concentré Sotra blond	4,80	12,50
Sotra Super	4,80	19,20

Or 1 cc de cette solution correspond à 0,32 mg d'acide ascorbique. Un litre de ce concentré dilué contient donc des réducteurs rapides équivalant à 64 mg d'acide ascorbique et comme le concentré a été dilué environ 5 fois (200 g au litre), un kilog de concentré en contient 320 mg compte non tenu de la partie oxydée au moment de la dilution qui à priori n'est pas négligeable. Comme il y aurait probablement des possibilités de développer ce pouvoir réducteur en intervenant soit sur la température, soit sur le pH du moût de départ, il serait peut-être possible de fabriquer pour la cidrerie des concentrés très réducteurs, dérivés de la pomme.

Dans notre esprit, l'intérêt de ce test serait de traduire dans la pratique, les résultats obtenus au laboratoire par des dosages chimiques potentiométriques.

Le test lui-même est facile à exécuter, mais la solution est instable et ne se conserve que 15 jours. De plus comme l'ont montré W. HEYER et E. PAUKNER (22) sur trois produits commerciaux, on note des diffé-

rences notables, tant au point de vue solubilité qu'au point de vue impuretés. Il est donc nécessaire d'effectuer le dosage de la solution, ce qui rend le test beaucoup plus difficile. La solution serait peut-être d'utiliser des comprimés de dichlorophénol soigneusement dosés à la fabrication, analogues à ceux utilisés en médecine pour le dosage de l'acide ascorbique.

IV. — ORIENTATION DES TRAVAUX

Ces quelques résultats ne constituent que les travaux préliminaires d'un programme plus vaste. Il nous convient en effet de déterminer la nature, l'importance relative, le potentiel normal des systèmes agissant dans le cidre et les dérivés des pommes et des poires, de déterminer les potentiels où se produisent les troubles d'oxydation, de traduire les résultats scientifiques en un ou plusieurs tests facilement utilisables dans la pratique cidricole.

Pour tendre vers ce but, nous envisageons :

1° De suivre la variation du potentiel, donc du rH, dans des cidres, de la fabrication à l'embouteillage et d'apprécier la répercussion, sur ce potentiel, des manipulations classiques, tant en cidrerie paysanne qu'en cidrerie industrielle : soutirages, centrifugations, filtrations, embouteillages.

2° D'établir l'ensemble des systèmes présents dans les jus et les cidres par des dosages potentiométriques à l'aide d'un oxydant à l'abri de l'air, en opérant après réduction par l'hydrosulfite ou le chlorure titaneux. L'opération en sens inverse, réduction après oxydation, nous permettra peut-être de déceler les systèmes partiellement irréversibles. Nous doserons les systèmes lents par rapport à l'électrode de platine, mais nous étudions actuellement la possibilité de la remplacer dans le dosage des systèmes rapides, où il faut opérer très vite, par une électrode à gouttes de mercure. Celle-ci présenterait l'avantage de donner des paliers plus nets, de séparer les systèmes rapprochés là où l'électrode de platine du fait de son inertie, nous donne la composante des divers systèmes.

3° De suivre l'évolution de l'oxygène dissous et ses répercussions sur les systèmes, par des dosages chimiques de l'oxygène et une étude polarographique.

4° De caractériser et de doser par des dosages chimiques ou chromatographiques, les systèmes susceptibles d'intervenir dans le cidre : cystéine, glutathion, mélanoïdines en particulier.

5° D'étudier l'influence du fer et du cuivre biologiques, et éventuellement des autres oligo-éléments sur le système redox.

6° D'expérimenter divers antioxydants commerciaux : SO^2, acide

ascorbique, gallate d'éthyle, acide nordihydroguaïrétique, réductones et l'action des synergistes comme les citrates par exemple, en vue d'une application éventuelle dans l'industrie cidricole.

V. — CONCLUSIONS GÉNÉRALES

Les premiers résultats de cette étude, paraissent confirmer l'existence dans les cidres, à côté des systèmes des glucides évolués, de plusieurs autres systèmes non négligeables.

L'existence d'un ou plusieurs systèmes très sensibles aux environs des rH 19-20 explique peut-être la grande sensibilité des cidres, un rH de cette valeur caractérisant en effet un milieu relativement oxydant.

Les vitesses des réactions d'oxydation sont en général très supérieures aux vitesses des réactions de réduction ; ainsi une grande partie de l'oxydation doit donc être considérée comme irréversible même si elle affecte des systèmes théoriquement réversibles, du fait que les cidres sont des boissons consommées très rapidement après fabrication.

Reçu pour publication le 5 décembre 1953.

BIBLIOGRAPHIE

(1) Deux (Y.). — Le rôle de l'oxygène et des substances réductrices en brasserie. *Bulletin de l'Association des Chimistes*, n° 4-6, avril-juin 1945, p. 111-134.
(2) Smock (R. M.) et Neubert (A. M.). — Apples and apple products. *Intersc. Publish. Inc. New-York*, p. 83-87, 1950.
(3) Bogdanski (C.). — Contribution à l'étude du système oxydo-réducteur des jus de pommes. *Thèse Université*, Paris 1950.
(4) Creff (R.) et Jacquin (P.). — La casse ferrique des cidres. Etude critique de quelques méthodes curatives ou préventives d'élimination du fer. A l'impression, *Ann. techn. I. N. R. A.*
(5) Wurmser (R.). — Oxydations et réductions. *Presses Universitaires France*, Paris 1930.
(6) Geloso (J.). — Relation entre le vieillissement des vins et leur potentiel d'oxydo-réduction. *Ann. de la Brasserie et de la Distillerie*, n° 12-13-17-18, 1931.
(7) Ribereau-Gayon (J.). — Contribution à l'étude des oxydations et des réductions dans les vins. *Thèse Sciences Physiques*, Bordeaux 1931. Traité d'Œnologie. Librairie Polytechnique Béranger, Paris et Liège, 1947.
(8) Genevois (L.) et Ribereau-Gayon (J.). — Le Vin, Hermann et Cie, Paris.
(9) Van Laer et Tilly. — *Ann. Fermentations*, 1939-40, n° 5, p. 418.
(10) Hartong. — *Wochsch. Brau.* 1934 ; **51**, 409.
(11) Gray, Stone et Rotschild. — *Wallerstein. Lab. Comm.*, 1939, n° 7, p. 219.
(12) Enders, Theis et Hegenforder. — *Wochsch. Brau.* 1928, **55**, 305.
(13) De Clerck (J.). — Cours de Brasserie. Tome I (Troubles colloïdaux) Imp. Van Linthout, Louvain 1948.

(14) URION et CHAPRON. — Communication au Congrès de Brasserie de Nice. Mai 1953.
(15) WURMSER et MAYER (N.). — *Comptes rendus Ac. Sci.* 1932, **194**, p. 888.
(16) FLANZY (M.). — *Revue Horticole*, p. 343, n° 83, 1935.
(17) AULE (O.). — *Svenska Mejeritidningen*, 43e année, n° 29-30, p. 319-323. Analysé dans *Le lait*, janvier-février 1953, p. 57.
(18) DECKER (C. W.) et ASHWORTH (U. S.). — Utilisation des antioxydants acide ascorbique et citrate de sodium. *Journal of Dairy Science*, **34**, n° 7, juillet 1951, p. 633-640. Analysé dans *Le Lait*, janvier-février 1953 p. 61.
(19) GRAY et STONE. — *Wallerstein Lab. Comm.* 1939, n° 5.
(20) DE CLERK (J.). — Cours de Brasserie, Tome II (Méthodes d'analyse et contrôle de la fabrication) — Imp. Van Linthout, Louvain 1948.
(21) RENTSCHLER (H.) et TANNER (H.). — Uber die Redox potential von Getränken. *Mitteilungen aus dem Gebiete der Lebensmitteluntersuchung und Hygiene (Travaux de chimie alimentaire et d'hygiène)*, 1952, **43**, fasc. 4.
(22) HEYER (W.) et PAUKNER (E.). — Neuere Erfahrungen über I. T. T. *Brauwiss.* 1952, **208**, 14.

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE DE LA FORMATION DES PRODUITS SECONDAIRES DE LA FERMENTATION ALCOOLIQUE

par

Mlle Madeleine LAFON

Ingénieur-Chimiste E. C. B.
Docteur ès Sciences physiques

PLAN DU MÉMOIRE

INTRODUCTION

CHAPITRE PREMIER

MÉTHODES ANALYTIQUES

I. — **Étude d'une méthode de dosage de l'acide succinique.**

a) Essai de la technique de Marignan.
b) Précipitation de l'acide succinique à l'état de succinate de baryum.
c) Étude d'une titration potentiométrique.
d) Mode opératoire de la méthode proposée.
e) Recherche de substances donnant de l'acide succinique par oxydation permanganique. Recherche de 1,4 butanediol.

II. — **Dosage des composés acétoïniques.**

III. — **Dosage de l'acide formique et du formol.**

CHAPITRE II

ÉTABLISSEMENT DES BILANS DES PRODUITS SECONDAIRES DE LA FERMENTATION AVEC DIVERSES LEVURES

I. — **Etude des Saccharomyces ellipsoïdeus.**

II. — **Etude des levures appartenant à d'autres genres.**

III. — **La classification d'Antoniani.**

IV. — **Conclusions.**

CHAPITRE III

INFLUENCE DES CONDITIONS DE LA FERMENTATION SUR LA FORMATION DES PRODUITS SECONDAIRES

I. — **Influence de l'aération.**
II. — **Influence de la concentration en ions H^+.**
III. — **Influence de la température.**
IV. — **Influence de la nature du milieu.**
V. — **Influence des facteurs de croissance.**
VI. — **Influence de la teneur en sucre.**
VII. — **Action d'un activeur de fermentation d'origine fongique.**
VIII. — **Conclusions.**

CHAPITRE IV

ÉTUDE DE L'ÉVOLUTION DE LA TENEUR EN ÉTHANAL AU COURS DE LA FERMENTATION

I. — **Influence de la teneur en azote ammoniacal.**
II. — **Influence de la concentration en ions H^+.**
III. — **Influence de la température.**
IV. — **Influence de la teneur en sucre.**
V. — **Influence d'un enrichissement en thiamine et d'un activeur de fermentation d'origine fongique.**
VI. — **Évolution de l'éthanal au cours de la fermentation par trois espèces de levures.**
VII. — **Conclusions.**

CHAPITRE V

FERMENTATIONS DÉVIÉES ET FORMATION DES PRODUITS SECONDAIRES

I. — **Additions d'éthanal au cours de la fermentation.**
  a) Bilan de l'éthanal.
  b) Formation d'acide citrique.
  c) Formation d'acide lactique.
II. — **Additions d'acide pyruvique au cours de la fermentation.**
  Bilan de l'acide pyruvique.
III. — **Fermentations en présence d'acides gras volatils.**
  a) Addition d'acide acétique.
  b) Evolution de l'éthanal et de l'acide acétique dans des fermentations en présence d'acide acétique.
  c) Fermentation en présence d'acide formique.
  d) Discussion.

CHAPITRE VI

ÉTUDE DE LA FORMATION DE L'ACIDE SUCCINIQUE

CHAPITRE VII

ÉTUDE DE LA FORMATION DE L'ACÉTOINE ET DU 2, 3-BUTANEDIOL

I. — **Mécanisme de la formation de l'acétoïne.**
II. — **Equilibre entre l'acétoïne et le 2,3-butanediol.**

CHAPITRE VIII

CONCLUSIONS GÉNÉRALES

BIBLIOGRAPHIE

INTRODUCTION

Le point de départ de notre étude est l'hypothèse formulée par L. Genevois en 1936 (31), d'après laquelle les produits secondaires formés au cours de la fermentation alcoolique dérivent de la fermentation glycéropyruvique du sucre ; le glycérol représente la contre-partie des autres produits secondaires, cette équivalence pouvant être exprimée par une relation quantitative.

On sait en effet que la fermentation alcoolique du sucre par la levure ne forme pas uniquement de l'alcool et du gaz carbonique. On trouve toujours dans le milieu fermenté d'autres produits qui représentent une fraction non négligeable du sucre initial. On les appelle les produits secondaires de la fermentation.

L'équation de Gay-Lussac :

$$C_6H_{12}O_6 \rightarrow 2C_2H_6O + 2CO_2$$

était une simple relation pondérale entre le sucre, l'alcool et le gaz carbonique. On admettait d'ailleurs que cette relation n'était pas absolument exacte, car Lavoisier avait signalé la formation d'un acide organique qu'il pensait être l'acide acétique.

C'est Pasteur qui le premier démontra l'existence d'autres produits de la fermentation. Dès 1858, il signalait la formation normale et constante d'acide succinique et de glycérol à partir du sucre dans la fermentation alcoolique (94). Dans son mémoire de juin 1859 (95), où il résu-

mait ses études sur la fermentation alcoolique, il établissait les différentes proportions des produits formés :

« Sur 100 g de sucre qui fermentent, 5 à 6 g ne suivent pas l'équation de LAVOISIER et de GAY-LUSSAC, et cette portion de sucre se transforme en assimilant de l'eau de manière à fournir dans les cas les plus ordinaires :

Acide succinique	0,6 à 0,7 g
Glycérine	3,2 à 3,6 g
Acide carbonique	0,6 à 0,7 g
Cellulose, matières grasses et autres produits encore indéterminés	1,2 à 1,5 g
	5,6 à 6,5 g

Le reste du sucre paraît former équation avec tout l'alcool et le surplus de l'acide carbonique suivant les rapports de l'égalité de LAVOISIER et de GAY-LUSSAC.

PASTEUR donnait ainsi le premier bilan de la fermentation faisant intervenir des produits secondaires. Il rechercha le glycérol et l'acide succinique dans les vins, et les teneurs qu'il y trouva sont de l'ordre de celles que nous donnent les dosages actuels ».

On connaît aujourd'hui la présence d'autres produits de la fermentation. Déjà BÉCHAMP, en 1863 (9), observa la formation d'acide acétique au cours de la fermentation alcoolique en anaérobiose, en quantités allant de 0,3 à 0,7 p. 100 du sucre fermenté. DUCLAUX a confirmé le fait en 1874 (23). La découverte du 2,3-butanediol remonte à HENNINGER (43), qui en 1882 signala dans les vins un glycol en C_4 ; il le nomma isobutylèneglycol et on l'a depuis identifié comme étant le 2,3-butanediol. Six ans plus tard HENNINGER et SANSON (44) démontrèrent que c'était un produit normal de la fermentation du sucre par les levures.

CLAUDON et MORIN (19) en 1887 ont dosé les produits de la fermentation du sucre par les levures elliptiques. Ils ont obtenu, en g pour 100 kg de sucre :

Aldéhyde	traces
Alcool éthylique	50 615
Alcool propylique normal	2,0
Alcool isobutylique	1,5
Alcool amylique	51,0
Éther œnanthique	2,0
« Isobutylène glycol »	158
Glycérol	2 120
Acide acétique	205
Acide succinique	452

LABORDE (64) en 1899 fit une étude soignée de la formation du glycérol ; il observa qu'elle dépend du milieu, de la variété de levure, de la nature du sucre ; elle augmente avec l'acidité, la température et la proportion de sucre. Il remarqua aussi qu'il se forme davantage de glycérol au début de la fermentation : dans la fermentation d'un moût à 180 g de sucre par litre, les 60 premiers grammes donnent 5,46 p. 100 de glycérol, alors que les derniers 60 grammes n'en donnent que 0,75 p. 100.

La question de l'origine de l'aldéhyde formée au cours des fermentations préoccupa beaucoup de chercheurs. SCHUTZENBERGER et DESTREM (126), en 1879, indiquent la formation d'aldéhyde au cours de fermentations en anaérobiose et affirment que cette formation est liée à la décomposition du sucre. ROESER (125) pensait de même en 1893, mais pour KAYSER et DEMOLON (54) et pour TRILLAT et SAUTON (138), il ne se formerait pas d'aldéhyde en anaérobiose ; sa présence dans les fermentations aérobies serait due à l'oxydation de l'alcool. KOSTYTSCHEW et HUBBENNET (60) en 1912 et PELTIER (97) en 1913 ont prouvé que l'éthanal est un produit intermédiaire de la fermentation alcoolique du sucre, en démontrant sa formation dans les fermentations à l'abri de l'air et sa disparition après une addition au cours de la fermentation. Ajoutant du butanal à des fermentations, PELTIER y trouvait du butanol ; il en concluait par analogie que la disparition de l'éthanal est due à sa transformation en éthanol. LEBEDEW et GRIAZNOFF en 1912 affirmaient aussi que l'éthanal est un produit intermédiaire de la transformation du sucre (70).

Les premiers essais d'explication chimique de la présence de ces corps remontent à 1910, date à laquelle NEUBAUER et FROMHERZ (83) émirent l'hypothèse que l'acide pyruvique pouvait jouer un rôle intermédiaire dans la formation de l'éthanal. En 1911, NEUBERG et ses collaborateurs (85) ont vérifié ces déductions et montré que l'acide pyruvique est facilement scindé en gaz carbonique et éthanal par une diastase sécrétée par la levure, la carboxylase.

En 1913, FERNBACH et SCHOEN (28) mirent en évidence la formation d'acide pyruvique dans des fermentations conduites en présence de carbonate de calcium. Ces mêmes auteurs montrèrent en 1914 (29) que dans un milieu purement minéral, toujours en présence de carbonate de calcium, le taux d'acide pyruvique croît proportionnellement au sucre consommé : il était donc ainsi prouvé que l'acide pyruvique provient du sucre et qu'il est un produit intermédiaire de la fermentation alcoolique. Mais ces auteurs ne purent l'identifier dans des fermentations en milieu acide où il disparaît en effet aussi vite qu'il est formé. Cependant BRÉCHOT et HAAG en 1939 (13) ont réussi à le caractériser dans la fermentation d'un milieu minéral acide.

Entre 1910 et 1925, NEUBERG et ses collaborateurs publièrent de nombreux travaux dans lesquels ils cherchaient à expliquer le mécanisme de formation des produits secondaires. Après avoir nié, en même temps que BUCHNER, la possibilité de la formation de l'éthanal à partir du sucre et soutenu sur ce sujet une polémique contre KOSTYTSCHEW (88), NEUBERG devait finalement apporter à cette théorie la meilleure preuve en utilisant une méthode de captation de l'éthanal par un de ses réactifs introduit dans le milieu en fermentation ; la formation des produits

secondaires est alors modifiée. L'idée de ce procédé remonte à Jean-Baptiste Dumas (24). Kostytschew (59) l'avait utilisé en employant comme agent de captation le chlorure de zinc et Müller-Thurgau et Osterwalder (79), Connstein et Luedecke (20) et Schweizer (127) avaient déjà montré que l'éthanal et le glycérol s'accumulent en présence d'acide sulfureux ou de sulfite de potassium. Ces derniers auteurs en avaient même déduit un procédé de fabrication industrielle du glycérol. Neuberg et ses collaborateurs fixèrent l'éthanal par le sulfite de sodium et par le dimédon et constatèrent que dans ce cas le glycérol s'accumule (89). Ils émirent l'hypothèse qu'à tout moment de la fermentation, il y a équivalence entre glycérol et éthanal, l'éthanal provenant de la décarboxylation de l'acide pyruvique. Neuberg et Reinfurth ont donc établi une deuxième forme de fermentation, ou fermentation glycéropyruvique (la première forme étant celle de Gay-Lussac) :

$$C_6H_{12}O_6 \rightarrow CH_3 \cdot CO \cdot COOH + C_3H_8O_3$$
$$C_6H_{12}O_6 \rightarrow CH_3CHO + CO_2 + C_3H_8O_3$$

Neuberg et Färber (84) montrèrent de même qu'en milieu alcalin la fermentation est profondément modifiée. Neuberg et Hirsch (86) établirent que dans ce cas l'éthanal subit une réaction de Cannizzaro : deux molécules d'éthanal donnent une molécule d'alcool et une molécule d'acide acétique. Finalement à une molécule d'acide acétique correspondent deux molécules de glycérol. C'est la troisième forme de fermentation du sucre, ou fermentation glycéroacétique :

$$2C_6H_{12}O_6 \rightarrow CH_3CH_2OH + CH_3COOH + 2CO_2 + 2C_3H_8O_3.$$

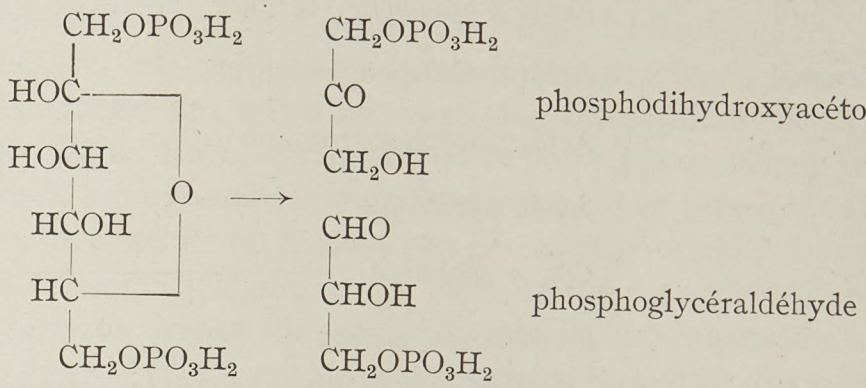
En réalité les trois types de fermentation précédents ne sont jamais purs ; il y a toujours un mélange de ces différentes réactions.

Neuberg et Reinfurth en 1923 (90) constatèrent que si l'on ajoute de l'éthanal à une fermentation, il se forme de l'acétoïne. Ce corps avait été déjà découvert en 1907 dans les vins par Salomone. Ils admirent qu'il prend naissance par condensation de deux molécules d'éthanal sous l'action d'un enzyme, la « carboligase ». En 1925, Kluyver, Donker et Visser't Hooft (58), utilisant la réaction de caractérisation de Lemoigne, montrèrent que la fermentation du sucre par la levure forme de l'acétoïne en aérobiose et du 2,3-butanediol en anaérobiose. Pritzker et Jungkunz en 1930 (115) redécouvrirent ce dernier dans les vins.

L. Genevois en 1936 (31) essaya de relier les différents produits secondaires par une relation quantitative ; il émit l'hypothèse que l'acide succinique, l'acide acétique, l'éthanal non transformé, le 2,3-butanediol et l'acétoïne sont formés par le mécanisme de la fermentation glycéropyruvique de Neuberg. Ils proviennent de l'acide pyruvique décarboxylé et doivent donc équivaloir le glycérol.

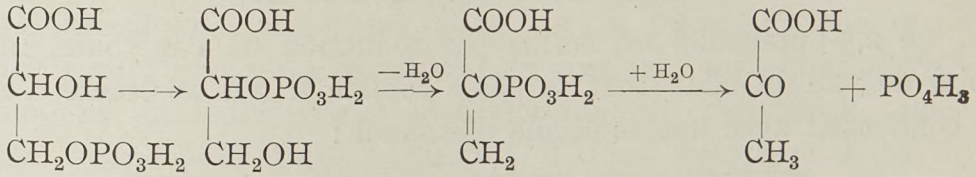
Le schéma de la théorie actuelle de la fermentation alcoolique a été donné par MEYERHOF, KIESSLING et SCHULZ en 1937 (76) ; nous en donnerons ici un aperçu rapide, nécessaire à la compréhension de l'hypothèse de L. GENEVOIS.

Le premier stade de la fermentation fait intervenir l'acide phosphorique ; il se forme des esters phosphoriques du glucose, qui se transforment les uns dans les autres pour donner finalement l'ester fructose 1,6-diphosphorique ou ester de HARDEN et YOUNG ; celui-ci est scindé sous l'influence de la zymohexase en deux corps en C_3 :



Ces deux corps tautomères sont en équilibre sous l'influence d'une isomérase ; l'équilibre a lieu pour 96,5 p. 100 du premier et 3,5 p. 100 du second, mais comme c'est ce dernier qui est utilisé dans la suite des réactions, l'équilibre est constamment déplacé en sa faveur et finalement tout se passe comme si tout l'ester de HARDEN et YOUNG était transformé en phosphoglycéraldéhyde.

L'étape suivante est le mécanisme essentiel de la fermentation ; c'est une oxydoréduction qui porte sur une molécule de phosphoglycéraldéhyde et une molécule d'éthanal, celui-ci apparaissant plus loin dans la chaîne des réactions. Une molécule de phosphoglycéraldéhyde est oxydée en acide 3-phosphoglycérique, alors que la molécule d'éthanal est réduite en alcool. L'acide 3-phosphoglycérique donne naissance à l'acide pyruvique par une série de réactions :

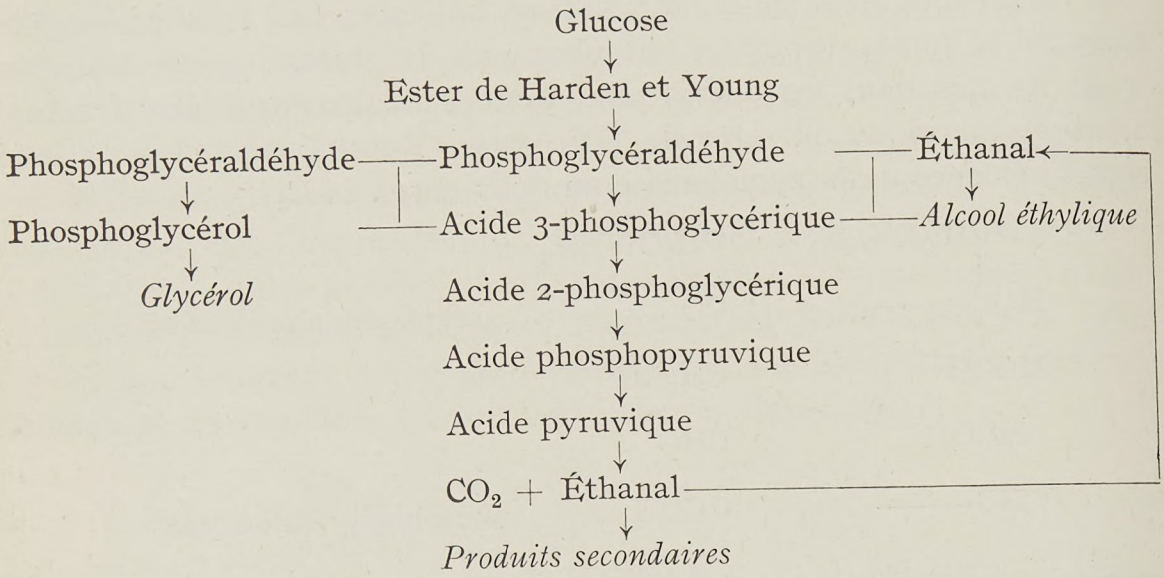


L'acide pyruvique est décarboxylé en éthanal par la carboxylase et l'éthanal subit l'oxydoréduction précédente.

Au cours de la phase d'induction, au début de la fermentation, alors qu'il n'y a pas d'éthanal dans le milieu, l'oxydoréduction porte sur deux molécules de phosphoglycéraldéhyde, dont l'une est réduite en glycérol et l'autre est oxydée comme précédemment en donnant finalement naissance à l'acide pyruvique : c'est la fermentation glycéropyruvique décou-

verte par NEUBERG. Elle est prépondérante au début, puis son pourcentage diminue et, comme il a déjà été indiqué, l'oxydoréduction normale conduit à l'alcool éthylique.

Le schéma suivant représente ces réactions :



On peut lier entre eux glycérol et produits secondaires par une relation numérique où chacun d'eux est affecté d'un coefficient tiré de l'équation chimique de sa formation. L. GENEVOIS admet les réactions suivantes :

La formation de l'acide succinique peut être représentée par l'équation globale :

$$5CH_3CHO + 2H_2O \rightarrow COOHCH_2CH_2COOH + 3CH_3CH_2OH \qquad (I)$$

qui donne le bilan du phénomène sans prétendre en donner le mécanisme.

L'acide acétique se forme par dismutation selon la réaction de la fermentation alcaline de NEUBERG :

$$2CH_3CHO + H_2O \rightarrow CH_3COOH + CH_3CH_2OH \qquad (II)$$

L'acétoïne est due à la condensation de deux molécules d'éthanal :

$$2CH_3CHO \rightarrow CH_3CHOHCOCH_3 \qquad (III)$$

Le 2,3-butanediol est formé par réduction de l'acétoïne, mais au point de vue du bilan tout se passe comme si une molécule d'éthanal se condensait avec une molécule d'éthanol :

$$CH_3CHO + CH_3CH_2OH \rightarrow CH_3CHOHCHOHCH_3 \qquad (IV)$$

Soient s, a, m, b, h et g les concentrations respectives en acide succinique, acide acétique, acétoïne, 2,3-butanediol, éthanal et glycérol. L. GENEVOIS propose la relation :

$$5s + 2a + b + 2m + h = \Sigma = g \qquad (V)$$

C'est cette équation qui nous servira d'hypothèse de travail dans la suite de notre étude.

Cette relation a été vérifiée déjà dans un certain nombre de cas par L. GENEVOIS, E. PEYNAUD et J. RIBÉREAU-GAYON (36). En réalité, il est apparu presque toujours un déficit et les auteurs observent que le plus souvent Σ est voisin de 0,9 g.

Les équations (I), (II), (III) et (IV) ont donné lieu à des recherches afin de préciser leur mécanisme (32).

D'autres corps ont été mis en évidence comme sous-produits normaux de la fermentation alcoolique. E. PEYNAUD et J. RIBÉREAU-GAYON (119), puis KIESSLING (56), ont montré avec certitude la formation constante de petites quantités d'acide lactique. PASTEUR niait la formation de cet acide par la fermentation alcoolique, mais par contre d'autres auteurs ont vu en lui un produit intermédiaire de la fermentation alcoolique. Enfin FERNBACH et SCHOEN (30) l'avaient mis en évidence dans la fermentation d'un milieu minéral en présence de carbonate de calcium, mais ils ne tiraient pas de conclusion quant à sa formation dans la fermentation normale. L'acide lactique provient d'une fermentation lactique directe du sucre, distincte de la fermentation alcoolique.

E. PEYNAUD (98) a également montré la formation d'une faible quantité d'acide citrique dans la fermentation alcoolique en anaérobiose. Le fait a été confirmé de nombreuses fois : GENTILINI (37), GOBIS (38), RODOPOULO (124). L. GENEVOIS a supposé que cet acide pouvait se former par déshydrogénation de l'acide acétique formé au début de la fermentation par une série de réactions faisant intervenir 9 molécules d'éthanal pour une molécule d'acide citrique (c). Il a donc ajouté à l'équation le terme $9c$. Elle devient :

$$5s + 2a + b + 2m + h + 9c = \Sigma = g \qquad \text{(VI)}$$

$9c$ est en effet de l'ordre de grandeur du déficit du Σ de l'équation (V) par rapport à g.

Tout récemment L. GENEVOIS (33), s'appuyant sur le fait que des levures fermentant sur un milieu chimiquement défini à base de saccharose, sans aucune trace de leucine, produisent des quantités notables d'alcool amylique, s'appuyant aussi sur la formation par certaines levures de caroténoïdes à partir d'acide acétique, par l'intermédiaire de l'acétone et de l'aldéhyde β méthylcrotonique (SCHOPFER, 1952), a formulé l'hypothèse d'une formation d'alcool amylique à partir de l'éthanal. Une molécule de glucose fermentant par les levures engendre 1 à 2 mmol d'alcool amylique.

Les réactions suivantes seraient en jeu :

$$2CH_3CHO + 2H_2O + 2A \rightarrow 2CH_3CO_2H + 2AH_2$$

$$2CH_3CO_2H \rightarrow CH_3COCH_3 + H_2O + CO_2$$

$$CH_3COCH_3 + CH_3CHO \rightarrow CH_3 - \underset{\displaystyle CH_3}{\overset{\displaystyle |}{C}} = CH - CHO + H_2O$$

L'alcool amylique serait le produit de réduction de l'aldéhyde β méthylcrotonique :

$$CH_3 - \underset{\displaystyle CH_3}{\overset{\displaystyle |}{C}} = CH - CHO + 2AH_2 \rightarrow CH_3 - \underset{\displaystyle CH_3}{\overset{\displaystyle |}{CH}} - CH_2 - CH_2OH + 2A$$

Finalement 3 mmol d'éthanal sont nécessaires pour donner 1 mmol d'alcool amylique. En représentant par y l'alcool amylique la relation devient, d'après GENEVOIS :

$$5s + 2a + b + 2m + h + 9c + 3y = \Sigma = g.$$

Cette relation, reconnue expérimentalement assez exacte dans les conditions normales de fermentation (si l'on met à part l'alcool amylique dont le dosage précis est difficile en milieu aussi dilué), doit être vérifiée dans toutes les conditions possibles. Les auteurs précédents l'ont confirmée seulement dans des cas où le taux de fermentation glycéropyruvique, et donc le glycérol formé, était assez peu variable.

Beaucoup de facteurs, en particulier le pH, la température, la composition du milieu, la présence des facteurs de croissance, etc. n'ont pas été étudiés. Cette relation, valable pour les *Saccharomyces*, n'a pas été étendue systématiquement à tous les genres de levures.

De plus le mécanisme de la formation des produits secondaires est encore discuté. La formation d'acide succinique, en tout ou partie, a été attribuée par certains auteurs à la transformation de l'acide glutamique selon le schéma d'EHRLICH, et même simplement du glycocolle, ou d'autres acides aminés, grâce à un phénomène de transamination. D'autre part, l'acide acétique d'un milieu fermenté peut provenir parfois d'un mécanisme oxydatif. Enfin la formation des dérivés butanedioliques a donné lieu à un grand nombre de travaux pour fixer la voie enzymatique suivie.

Il nous a donc paru nécessaire de préciser les réactions intermédiaires qui conduisent à la formation des produits secondaires. Nous avons pensé également que l'hypothèse de L. GENEVOIS méritait une plus ample confirmation.

Notre travail constitue une étude analytique de ces problèmes. Nous nous proposons tout d'abord d'étudier les méthodes de dosage des corps intervenant dans les bilans précédents. Nous avons été ainsi conduits à mettre au point et à adapter de nouvelles méthodes analytiques.

Nous déterminons la formation des produits secondaires avec un très grand nombre d'espèces de levures et dans différentes conditions de fermentation. L'aération, le pH, la température, la nature du milieu, la teneur en facteurs de croissance, l'influence des activeurs sont étudiés. Nous fixons entre quelles limites et dans quelles conditions cette hypo-

thèse demeure valable et se trouve confirmée, dans quels cas au contraire certains produits secondaires sont formés par d'autres voies.

Nous suivons ensuite les variations de la teneur en éthanal libre au cours de la fermentation et nous envisageons leur relation avec la formation des produits secondaires. Cette quantité d'éthanal libre dépend du taux de la fermentation glycéropyruvique et de la vitesse d'utilisation vers la formation des produits secondaires ; elle éclaire donc certains mécanismes.

Enfin, nous cherchons, en utilisant notamment des techniques de fermentations déviées, à préciser le mécanisme de formation de certains produits secondaires. Nous discutons particulièrement les cas de l'acide succinique et des produits butanedioliques.

Chapitre premier

MÉTHODES ANALYTIQUES UTILISÉES

Nous avons utilisé pour l'analyse des milieux fermentés, les méthodes énumérées ci-après. Beaucoup de ces méthodes avaient été mises au point dans les laboratoires de la Station œnologique, d'autres ont dû être adaptées par nos soins.

Pour doser le glycérol, nous avons utilisé dans les milieux non sucrés, la méthode Fatome modifiée par Peynaud (99) basée sur la réaction de Malaprade. Dans les milieux ayant plus de 50 g de sucre par litre, la défécation par la baryte ou la chaux en milieu alcoolique ne retient pas tout le sucre. Nous avons employé dans ce cas une technique utilisant la réaction colorée de l'acide chromotropique avec le formol obtenu par oxydation periodique du glycérol, décrite par Peynaud et Charpentié (106). La grande sensibilité de la réaction permet d'opérer la défécation sur le milieu sucré dilué, dans des conditions où elle est toujours efficace.

Le 2,3-butanediol a été dosé par la méthode Peynaud (100) par transformation en éthanal par oxydation periodique.

L'éthanal des milieux de fermentation est titré par la méthode Jaulmes et Espezel (48), après distillation à pH 8,5 (120). L'alcool a été déterminé par oxydation chromique, selon Cordebard (21).

L'acide acétique a été séparé par la méthode Duclaux-Gayon ; on a utilisé l'entraînement par la vapeur d'eau pour les mélanges d'acides volatils. L'acide lactique a été dosé selon la technique Peynaud et Charpentié (107), l'acide citrique par la méthode Kogan, modifiée par Peynaud.

Nos recherches nous ayant amenés à doser le méthanol, nous avons suivi la technique récemment publiée par Jacquin et Tavernier (47).

Nous avons établi un mode opératoire nouveau pour le dosage de l'acide succinique, simplification de la méthode de PEYNAUD (101). Nous avons encore précisé les conditions du dosage de petites quantités d'acide formique en présence d'acide acétique. Nous en donnons plus loin le mode opératoire, ainsi que celui du dosage colorimétrique du formol. Enfin, nous avons dû adapter les méthodes d'HOOREMAN (46) au dosage des composés acétoïniques dans les milieux de fermentation alcoolique.

I. — *Etude d'une méthode de dosage de l'acide succinique.*

Les méthodes utilisées jusqu'ici pour le dosage de l'acide succinique reposent sur une ou plusieurs des trois propriétés suivantes de cet acide : sa solubilité dans l'éther, l'insolubilité de certains de ses sels, notamment les sels de baryum, de plomb et d'argent ; sa résistance à l'oxydation.

PASTEUR employait pour doser l'acide succinique une technique non spécifique basée sur sa solubilité dans l'éther, puis il la remplaça par une méthode faisant appel à l'insolubilité du succinate de calcium. LABORDE aussi utilisa cette propriété (65).

D'autres auteurs, MACAGNO (71), ALBAHARY (2), ont utilisé l'insolubilité des sels de plomb et de fer ; MULLER (78), RAU (117), ESPIL (26), KUNZ (63), MESTREZAT (74), MUTTELET (80) et POZZI-ESCOT (114) ont basé leurs procédés sur l'insolubilité du succinate de baryum. De toutes ces méthodes qui, souvent, manquent de spécificité, la seule à retenir est celle de KUNZ, mais elle est d'application longue et compliquée. De plus, comme nous le verrons plus loin, la précipitation du succinate de baryum est, dans certains milieux fermentés, difficilement complète.

Bien d'autres méthodes ont été proposées, en particulier des techniques enzymatiques utilisant la succinodéshydrogénase. D'autres encore font appel à la chromatographie pour séparer les acides organiques des liquides fermentés : CLABORN et PATTERSON (18), NEISH (81). Peu de procédés colorimétriques ont été indiqués ; signalons cependant la méthode récemment publiée par BABIN (8), basée sur la possibilité de condensation des succinéines avec les phénols.

PEYNAUD (102) a proposé en 1946 un mode opératoire qui utilise une double extraction dans un appareil à épuisement continu. Une première extraction par l'éther entraîne l'acide succinique, accompagné de quantités variables d'autres acides. L'oxydation permanganique en milieu sulfurique détruit les acides organiques sans toucher à l'acide succinique. Après réduction de l'excès de permanganate par le bisulfite de sodium, on chasse les acides volatils par un barbotage de vapeur d'eau. Une deuxième extraction est nécessaire pour séparer l'acide succinique. On le précipite alors par le nitrate d'argent dans des conditions de pH

bien déterminées. On filtre et on détermine l'argent en excès par une solution titrée de sulfocyanure de potassium.

Ce procédé donne de bons résultats, mais il est long ; de plus, nous y reviendrons, la précipitation du succinate d'argent est délicate, et elle ne donne aucune garantie de spécificité, la présence d'ions étrangers compromettant les résultats.

MARIGNAN (72) a fait une étude très détaillée de la précipitation du succinate d'argent, de l'extraction par l'éther de l'acide succinique et de l'oxydation permanganique des autres acides. Il a proposé une méthode applicable aux milieux non sucrés.

L'auteur fait agir directement le permanganate sur le vin à analyser, fortement acidifié par l'acide sulfurique. Après avoir réduit l'excès de permanganate, il entraîne les acides volatils par la vapeur, puis il sépare l'acide succinique par une extraction continue à l'éther et le titre par argentimétrie.

a) Essai de la technique de Marignan

Nous avons appliqué cette méthode à des vins rouges et nous avons obtenu les résultats que donne le tableau I.

On constate qu'on trouve avec la méthode MARIGNAN d'autant plus d'acide succinique qu'on utilise davantage de permanganate pour l'oxydation. On peut tirer deux conclusions de cette observation : il est très difficile de déterminer la dose exactement nécessaire de permanganate, donc d'obtenir des résultats absolument corrects. L'augmentation du taux de l'acide succinique avec la dose de permanganate conduit à penser que l'oxydation directe du vin forme de l'acide succinique à partir de certains corps.

La première de ces remarques nous a incités à élaborer une méthode de dosage plus sûre. Lorsqu'elle a été mise au point, nous avons recherché les substances du vin qui par oxydation sont susceptibles de donner de l'acide succinique.

b) Précipitation de l'acide succinique à l'état de succinate de baryum

Nous avons tout d'abord cherché à établir une technique de précipitation quantitative de l'acide succinique du vin à l'état de sel de baryum, par insolubilisation dans l'alcool. Nous avons essayé la précipitation dans différentes concentrations d'alcool pour un milieu synthétique et pour différents vins rouges.

TABLEAU I

Dosage de l'acide succinique par la technique de Marignan

Vin rouge n° 1		Vin rouge n° 2		Vin rouge n° 3	
	Acide succinique dosé méq par l.		Acide succinique dosé méq par l.		Acide succinique dosé méq par l.
		Méthode Peynaud	22,0	Méthode Peynaud	11,0
		Méthode par précipitation (1)	21,0	Méthode par précipitation (1)	9,5
Méthode Marignan		Méthode Marignan		Méthode Marignan	
Permanganate ajouté		Permanganate ajouté :		Permanganate ajouté :	
60 cm³	15,6	20 cm³	12,2	20 cm³	8,5
80 «	16,8	28 »	18,2	25 »	9,3
90 «	18,8	30 »	21,0	30 »	16
100 «	22,4	35 »	23,0		
120 »	23,2	50 »	25,2		

(1) Voir plus loin le mode opératoire.

Nous avons opéré de la façon suivante : dans des tubes de centrifugeuse, on place 20 cm³ du liquide à analyser, on le neutralise par l'ammoniaque au quart en présence de phénolphtaléine et on ajoute 3 cm³ de chlorure de baryum à 30 p. 100. On porte le titre alcoolique respectivement à 70, 75, 80, 85 et 90° par addition d'alcool absolu. On laisse une nuit en glacière, on centrifuge ; on décante et on lave le précipité à l'alcool.

On dissout le dépôt à l'ébullition avec 50 cm³ d'eau distillée acidulée par 2,5 cm³ d'acide sulfurique au tiers. Après lavage, on élimine le sulfate de baryum formé. Le filtrat est concentré pour chasser l'alcool, on l'oxyde par une ébullition de 10 minutes avec 10 à 15 cm³ de permanganate de potassium en solution saturée. Après refroidissement, on détruit l'excès de permanganate par quelques gouttes de solution concentrée de bisulfite de sodium.

Les acides volatils sont chassés par entraînement à la vapeur de 300 à 400 cm³ d'eau, en concentrant le volume à moins de 20 cm³. Puis on procède à l'extraction par l'éther dans l'appareil de HAGEN ; on poursuit l'opération durant 5 heures. On précipite l'acide succinique extrait à l'état de succinate d'argent dans les conditions qu'indique MARIGNAN et on titre l'argent restant sur une partie aliquote, par le sulfocyanure de potassium N/20.

Le tableau II rassemble les résultats obtenus. On voit que la précipitation du succinate de baryum est difficile et reste toujours incomplète pour la solution synthétique, tandis qu'à partir de 75° d'alcool,

TABLEAU II

Degré alcoolique de précipitation du succinate de baryum.

Acide succinique trouvé en méq par litre.

Degré alcoolique de la précipitation	Solution synthétique (1) 20,0 méq par litre	Vin rouge
70°	17,0	13,7
75°	16,5	14,5
80°	16,0	14,5
85°	14,5	14,5
90°	19,5	14,0

(*) La solution synthétique contient tous les acides organiques du vin.

on obtient des chiffres remarquablement constants pour les vins rouges. Ces résultats différents tiennent aux difficultés de floculation du succinate de baryum en milieu simple, alors que dans les vins rouges des phénomènes d'entraînement réciproque des colloïdes assurent la précipitation complète. Ces mêmes difficultés se présentent pour les vins blancs pour lesquels la précipitation reste toujours partielle. Si l'on peut utiliser cette méthode pour la plupart des vins rouges, elle n'est donc pas applicable à d'autres milieux, et nous sommes revenus à l'extraction par l'éther comme moyen de séparation. Nous avons cependant cherché à éviter une double extraction. Pour ce faire, nous avons essayé de titrer directement l'acide succinique sur le liquide obtenu après oxydation des acides organiques et élimination des acides volatils. Ce liquide contient, à côté de l'acide succinique, de l'acide sulfurique et des sels de manganèse. Il n'est pas possible d'y effectuer la précipitation du succinate d'argent, et nous avons étudié un dosage acidimétrique au potentiomètre de QUÉRÉ (66).

c) Étude d'une titration potentiométrique

Nous avons vu qu'après l'oxydation, le liquide contient une certaine quantité d'acide sulfurique. Le pK de la deuxième fonction de l'acide sulfurique est 1,62 (KOLTHOFF), les pK de l'acide succinique sont 4,18 pour la première fonction (JONES) et 5,23 pour la seconde (KOLTHOFF). Pour titrer acidimétriquement tout l'acide succinique à 1 p. 100 près, il faudrait donc titrer à partir de pH 2,18, mais on compte alors une grande partie de l'acide sulfurique et les courbes de titration d'un mélange des deux acides ne présentent pas un palier caractéristique permettant un dosage. On tourne la difficulté en titrant de pH 4,18 à pH 7,5. A pH 4,18, tout l'acide sulfurique a été neutralisé, et on titre

ainsi la moitié de la première fonction succinique et les 9/10 de la seconde, soit au total les 7/10 de l'acide succinique du milieu.

Nous utilisons pour le titrage la baryte en solution N/20 de préférence à la soude, l'acide sulfurique étant ainsi éliminé à l'état de sulfate de baryum.

Nous avons expérimenté ce procédé sur des solutions de titres connus en acide succinique, additionnées de quantités variables d'acide sulfurique. Voici à titre d'exemple les résultats obtenus dans un cas. On opère sur 25 cm³ de solution d'acide succinique. Le titrage direct donne 19,2 méq d'acide succinique par litre.

Acide sulfurique ajouté	Acide succinique trouvé
—	—
0	19,4 méq
10 cm³ N/10	19,4
0,5 cm³ au tiers	19,2
1 cm³ au tiers	19,4

Ce mode de titrage est donc correct et peut être appliqué au dosage de l'acide succinique. Il est bon de souligner que ce procédé n'est pas moins spécifique que la titration par l'argent, qui ne donne des résultats valables qu'autant qu'on a éliminé tous les anions autres que l'anion succinique.

d) **Mode opératoire de la méthode proposée**

20 cm³ de liquide sont évaporés à moitié volume à feu doux pour chasser l'alcool, puis transvasés quantitativement dans le tube extracteur d'un appareil de HAGEN et additionnés de 1 cm³ d'acide sulfurique au tiers. On complète à 20 cm³. L'acide succinique est recueilli dans 10 cm³ d'eau distillée placés dans le ballon de l'appareil. La circulation de l'éther doit être rapide, l'eau du bain-marie étant maintenue à une température de 75 à 80° et la réfrigération étant énergique. Après 5 heures d'extraction, on distille l'éther, puis on oxyde le liquide extrait par le permanganate de potassium.

L'oxydation se fait dans le ballon même où a eu lieu l'extraction. On ajoute 1 cm³ d'acide sulfurique au tiers de façon à amener le pH à une valeur inférieure ou égale à 1, et 10 cm³ de permanganate de potassium en solution saturée. On porte à une douce ébullition pendant 15 minutes. Après refroidissement, on détruit l'excès de permanganate par quelques gouttes de bisulfite de sodium en solution concentrée, puis on chasse par la vapeur d'eau les acides volatils en distillant 300 à 400 cm³ d'eau.

Le milieu ne contient plus alors que les acides sulfurique et succinique. On amène à pH 4,18 par la baryte d'abord en solution saturée, puis N/20. On titre alors l'acide succinique par la baryte N/20, de pH

4,18 à pH 7,5 au potentiomètre QUÉRÉ. Soit n le nombre des cm³ de baryte N/20 qui ont été consommés.

On a vu que de pH 4,18 à pH 7,5 on titre les 7/10 de l'acide succinique. La teneur du milieu de fermentation en acide succinique, en milliéquivalents par litre, est alors donnée par la formule :

$$\frac{0{,}05 \times n \times 10 \times 1000}{7 \times 20} = n \times 3{,}57.$$

La précision obtenue est de l'ordre de 2 à 3 p. 100.

Nous avons éprouvé cette méthode sur des vins additionnés ou non d'acide succinique. Voici les résultats obtenus pour un vin blanc. Les chiffres sont des milliéquivalents par litre.

Acide succinique ajouté	Acide succinique trouvé	Acide succinique théorique
0	16,8	—
2	18,9	18,8
3	19,7	19,8

On retrouve les quantités ajoutées d'une manière très satisfaisante et nous avons adopté la technique décrite précédemment pour l'établissement de nos bilans.

e) Recherche de substances donnant de l'acide succinique par oxydation permanganique. Recherche du 1,4 butanediol

Dans le but d'expliquer l'augmentation du taux d'acide succinique observé dans la technique de MARIGNAN, nous avons oxydé des solutions de différentes substances existant dans les vins, et nous avons recherché l'acide succinique éventuellement formé.

Divers types de polyphénols ont été d'abord essayés : tanins, anthocyannes de raisin et du vin. Ils n'ont pas donné d'acide succinique, non plus que l'oxydation de différents acides aminés, entre autres l'acide aspartique et l'asparagine. Seuls l'acide glutamique et la glutamine donnent par oxydation permanganique en milieu sulfurique des quantités notables d'acide succinique. Le rendement est de 75 p. 100 pour l'acide glutamique et de 50 p. 100 pour la glutamine. Cependant leur taux dans les vins et les milieux fermentés est habituellement trop faible pour expliquer les erreurs en excès de 3 ou 4 méq qui ont été constatées.

S'il existe dans les milieux fermentés du 1,4-butanediol $CH_2OH.CH_2\ CH_2.CH_2OH$, celui-ci est transformé quantitativement en acide succinique par l'oxydation permanganique. Bien que ce glycol n'ait jamais été signalé comme un produit de la fermentation, l'hypothèse de sa formation, par un mode de condensation de l'éthanal différent de

celui du 2,3-butanediol, pourrait être envisagée. Nous avons donc recherché ce corps dans les vins.

Il est difficilement extractible par l'éther sulfurique, puisqu'une extraction deux fois plus longue que celle qui est nécessaire à épuiser tout l'acide succinique, ne livre que la moitié du 1,4-butanediol. On peut séparer ce corps par entraînement à la vapeur, en présence de carbonate de sodium anhydre. Il bout à 235° et est donc moins volatil que son isomère 2,3. Il faut recueillir 800 cm³ de distillat pour avoir tout le 1,4-butanediol d'une prise de 100 cm³, d'abord concentrée à 10 cm³.

Ce distillat est lui-même concentré lentement jusqu'à 20 cm³ sous une colonne de rectification à pointes de 50 cm de hauteur. On réalise un milieu N/2 en acide sulfurique, on ajoute 10 cm³ de solution saturée de permanganate de potassium, on porte 15 minutes à l'ébullition. L'acide succinique éventuellement formé est extrait par l'éther et titré potentiométriquement.

Ce mode opératoire permet de retrouver assez bien une addition de 1,4-butanediol faite à un vin, mais appliqué à une série de vins naturels, trois vins rouges et un vin blanc de Bordeaux, il nous a toujours donné des résultats négatifs. Cette recherche a été également négative sur le résidu de concentration sous reflux de 100 litres de liquide fermenté préparé de la façon suivante : on fait fermenter 5 kg de saccharose dissous dans 100 litres ; le milieu fermenté est neutralisé, distillé et la vinasse est concentrée sous reflux au volume d'un litre. Ce liquide contient donc la totalité des produits secondaires fixes de la fermentation de 5 kg de sucre. Ce n'est vraisemblablement pas à la présence de ce corps qu'est imputable l'erreur de la méthode MARIGNAN. Une ou plusieurs autres substances inconnues doivent intervenir.

II. — DOSAGE DES COMPOSÉS ACÉTOINIQUES

Nous nous sommes adressés pour ce dosage à la méthode d'HOOREMAN (46), basée sur la réaction classique de LEMOIGNE. L'acétoïne est transformée en diacétyle par oxydation par le chlorure ferrique et celui-ci est dosé, après son oximation, sous forme de diméthylglyoxime nickelique.

$$CH_3 - CHOH - CO - CH_3 \xrightarrow{O} CH_3 - CO - CO - CH_3$$

$$CH_3 - CO - CO - CH_3 \xrightarrow{NH_2OH,\ ClH} HON = C(CH_3) - C(CH_3) = NOH$$

$$HON = C(CH_3) - C(CH_3) = NOH \xrightarrow{Cl_2Ni\ +\ NH_4OH} (HON = C(CH_3) - C(CH_3) = NOH)_2NiO.$$

HOOREMAN a défini avec une grande précision les conditions dans lesquelles l'oxydation se fait avec un rendement constant de 94 p. 100

et mis au point un procédé de dosage colorimétrique très sensible pour le diacétyle.

Pour former le complexe nickelique soluble coloré en rouge, on tamponne par l'acétate d'ammonium et on doit se placer en milieu légèrement oxydant par addition de brome. On ajoute alors le sel de nickel et passe en milieu fortement ammoniacal. On mesure au photocolorimètre la coloration rouge obtenue et on rapporte à une droite d'étalonnage.

Cette méthode a dû être légèrement modifiée pour pouvoir être appliquée aux milieux riches en alcool. En effet, comme l'indique HOOREMAN, l'alcool à dose supérieure à 200 mg par litre gêne lors du dosage final. L'auteur fait remarquer que « les vins sont des milieux très complexes qui, par litre, contiennent environ 100 g d'éthanol et, au plus, 20 mg d'acétoïne seulement ; dans ces conditions la précision du dosage de l'acétoïne ne peut pas être très grande ».

Après plusieurs essais, nous avons constaté qu'il était possible de chasser très simplement l'alcool par rectification sous colonne à pointes, après la formation de la diméthylglyoxime, sans aucune perte de produit.

HOOREMAN a également proposé un dosage du 2,3-butanediol dans lequel ce corps est oxydé par le brome en acétoïne avec un rendement constant de 90 p. 100. Nous avons adapté cette méthode aux milieux riches en alcool et nous l'avons utilisée pour des dosages dans les eaux-de-vie. Mais pour les milieux fermentés, nous avons préféré employer la méthode PEYNAUD plus facile et plus rapide et qui s'applique directement sans dilution.

La sensibilité de la méthode colorimétrique est très grande : 0,1 mg de diméthylglyoxime dans 20 cm^3 donne une bonne lecture sur le tambour de l'électrophotomètre MEUNIER. Utilisant par la suite le diffuso-absorptiomètre DOGNON, nous avons pu avoir une sensibilité encore supérieure. Or, il est toujours possible, grâce à la grande volatilité du diacétyle de le concentrer dans un volume très faible.

D'autre part la réaction a une grande spécificité ; seul le méthylglyoxal, exceptionnel d'ailleurs dans les milieux biologiques, donne, dans les conditions du dosage, une coloration rouge semblable à celle de la diméthylglyoxime nickelique. Mais on peut facilement éviter toute confusion avec le diacétyle car, par réduction avec le chlorhydrate d'hydroxylamine, la coloration due au méthylglyoxal vire au jaune sans qu'il se forme de précipité ; la diméthylglyoxime nickelique au contraire, donne par réduction un précipité rouge de diméthylglyoxime nickeleuse (HOOREMAN).

Nous ne redonnerons pas ici les détails du mode opératoire, qui ont été publiés dans une étude des composés acétoïniques dans les eaux-de-vie (109), travail auquel nous renvoyons.

ANDRÉ et DUPUY (3) ont trouvé que la présence d'éthanal dans la prise d'essai provoque l'apparition d'un précipité de diméthylglyoxime

nickeleuse et rend les résultats inexacts. Ils ont préféré utiliser la réaction colorée que donne le diacétyle avec l'α-naphtol et la créatine (ou la créatinine), suivant la méthode de WESTERFELD (145).

Dans les milieux fermentés ou les eaux-de-vie que nous avons analysés suivant la méthode HOOREMAN, nous n'avons, pour notre part, jamais été gênés par l'éthanal.

D'autre part, la méthode de WESTERFELD manque de spécificité. Si nous avons retrouvé parfaitement une addition connue de diacétyle, nous avons obtenu lorsqu'a été suivie par cette méthode la formation du diacétyle au cours de la fermentation, des chiffres très élevés, 100 à 120 mg par litre, alors que la méthode d'HOOREMAN indiquait des teneurs de l'ordre du mg. La réaction de WESTERFELD est moins spécifique que celle d'HOOREMAN et en particulier, il apparaît qu'elle est inutilisable pour le dosage du diacétyle dans le cas des milieux en cours de fermentation.

Nous avons donc continué à appliquer la méthode d'HOOREMAN au dosage de l'acétoïne dans les milieux de fermentation en vue de l'établissement des bilans.

Cette méthode nous a également permis de rechercher et de doser le diacétyle et l'acétoïne dans un certain nombre de vins. Les résultats obtenus font l'objet du tableau III. Ils montrent qu'il existe dans tous les vins, de petites quantités de diacétyle, qui n'avaient pas été signalées avant nos premiers travaux.

TABLEAU III

Teneurs en composés acétoïniques des vins

Teneurs en mg par litre

	2,3-butanediol	Acétoïne	Diacétyle
Pauillac, 1950 :			
vin de goutte n° 1	612	7,8	0,5
vin de goutte n° 2	513	9,6	0,7
vin de presse n° 1	653	3,0	0,6
vin de presse n° 2	651	6,8	0,9
vin de presse n° 3	619	3,6	0,4
Médoc, 1950 :			
vin de goutte n° 1	601	11,6	0,9
vin de goutte n° 2	720	10,7	0,3
vin de presse n° 1	729	4,0	0,3
vin de presse n° 2	606	13,6	0,5
vin de presse n° 3	783	3,6	0,3
Pauillac, 1928	762	12,1	0,3
Margaux, 1950	535	7,6	0,4
Saint-Julien, 1950	492	2,0	0,4
Vin rouge d'Algérie :			
$13^{0}7$	1 260	15,2	1,6
$13^{0}9$	1 293	30,3	1,6
$14^{0}9$	1 485	84	1,8
Preignac n° 1, 1950	628	4,6	traces
Preignac n° 2, 1950	750	5,4	traces
Sauternes, 1950	828	5,2	traces

III. — DOSAGE DE L'ACIDE FORMIQUE ET DU FORMOL

Le principe du dosage de l'acide formique en présence d'acide acétique est basé sur la destruction de l'acide formique par oxydation dans des conditions telles que l'acide acétique n'est pas touché. Ces conditions ont été étudiées par POUX et OURNAC (113) pour l'oxydation periodique et par VERGNAUD (43) pour l'oxydation permanganique.

Nous avons mis au point le mode opératoire suivant : 20 cm³ du liquide fermenté sont soumis à un entraînement par la vapeur (après passage sous vide pour enlever le gaz carbonique) ; on recueille 600 cm³ de distillat qui contiennent la totalité des acides volatils de la prise d'essai. On titre à la soude N/10, soient n cm³ utilisés. On concentre alors à 20 cm³, on ajoute 1 cm³ de solution tampon à pH 7 concentrée (150 g de phosphate disodique et 33,5 g de phosphate monopotassique par litre) et 2 cm³ de permanganate de potassium en solution saturée, et on porte 10 minutes dans un bain-marie maintenu à 50°. Après refroidissement, on ajoute 2 ou 3 gouttes d'acide sulfurique pur et 2 ou 3 cm³ de sulfate ferreux en solution saturée. On passe à nouveau sous le vide d'une trompe à eau et on soumet à un nouvel entraînement à la vapeur en recueillant 400 cm³ de distillat. L'acide formique ayant été détruit, celui-ci ne contient que l'acide acétique de la prise d'essai. On titre par la soude N/10 ; soient n' cm³ utilisés.

Nous avons fait un essai à blanc pour déterminer la quantité de soude consommée par 400 cm³ de distillat dans ces conditions ; nous avons trouvé qu'il fallait retrancher 0,25 cm³ de la valeur n'.

(n' - 0,25) nous permet de calculer l'acide acétique de la prise d'essai, et n l'acidité volatile totale ; l'acide formique s'obtient par différence.

La méthode de dosage utilisée pour le formol repose sur sa réaction colorée spécifique avec l'acide chromotropique.

25 cm³ de liquide fermenté sont soumis à l'entraînement par la vapeur et on recueille 50 cm³ de distillat. On effectue la réaction colorée sur 5 cm³ de ce distillat suivant le mode opératoire du dosage du glycérol. On ajoute 5 cm³ de réactif chromotropique (préparé extemporanément en mélangeant 5 cm³ d'une solution d'acide chromotropique à 5 g dans 100 cm³ d'eau distillée et 100 cm³ d'acide sulfurique pur). Après agitation, on porte 30 minutes au bain-marie bouillant. Puis on refroidit et on complète à 25 cm³. On détermine la densité optique et on rapporte à une courbe d'étalonnage.

Chapitre II

ÉTABLISSEMENT DES BILANS DES PRODUITS SECONDAIRES DE LA FERMENTATION AVEC DIVERSES LEVURES

Il est évident que la formation relative des différents produits secondaires par la levure est déterminée par la richesse de cette cellule en les enzymes responsables de leur élaboration. Ainsi des levures riches en aldéhydomutase forment beaucoup d'acide acétique, et la présence de grosses quantités d'acétoïne et de 2,3-butanediol signifie chez la levure un taux élevé d'enzyme de condensation butanediolique. On peut dire que la composition du liquide fermenté représente dans une certaine mesure la composition enzymatique de la levure et on peut tenter de baser sur ce critère une différenciation des levures.

Les classifications des levures reposent sur des propriétés morphologiques : caractères de la reproduction végétative, forme et taille des cellules, formation et forme des spores, aspect des cultures en milieu solide et colonies géantes, etc. On sait qu'on définit de cette façon trois grandes familles : Endomycetaceae, Sporobolomycetaceae et Cryptococcaceae, à l'intérieur desquelles on distingue des sous-familles, elles-mêmes divisées en tribus puis en genres. La considération des propriétés physiologiques telles que fermentation et assimilation des différents sucres, assimilation des nitrates, production de pigments, d'esters, d'acides, etc. intervient surtout pour différencier quelques espèces de levures dans un même genre.

Certains auteurs ont proposé d'ajouter à ces propriétés morphologiques et fermentatives une caractérisation des levures d'après leurs besoins vitaminiques ; la connaissance de ces besoins fournit un complément intéressant aux propriétés envisagées précédemment.

Il semble qu'une autre classification serait possible : celle qu'on établirait d'après les teneurs de chaque levure en chaque enzyme. Nos connaissances actuelles ne le permettent pas, mais la considération des produits secondaires formés paraît pouvoir servir de base à une différenciation physiologique qui, en dernière analyse, repose sur le système enzymatique de la levure. Cette différenciation interviendrait surtout dans le cadre de l'espèce.

En 1892, Kayser (53) avait déjà essayé de classer les levures elliptiques d'après le taux de formation d'acides volatils ; mais cette production varie aussi avec de nombreux autres facteurs et il en est de même pour la production du glycérol, de l'acide succinique et des autres produits secondaires. Laborde (64), Wortmann (147) avaient remarqué

que le taux de glycérol varie avec la race de levure. VENTRE (141) avait de même signalé en 1934 que les levures se différencient par la production de glycérol et d'acide acétique.

E. PEYNAUD et J. RIBÉREAU-GAYON (travaux déjà cités et en particulier 111), étudiant les *Saccharomyces ellipsoïdeus*, ont remarqué que les produits secondaires formés varient beaucoup d'une levure à l'autre et que les rapports entre certains de ces produits, tels que les rapports $\frac{\text{acide acétique}}{\text{acide succinique}}\left(\frac{a}{s}\right)$ et $\frac{\text{2,3-butanediol}}{\text{glycérol}}\left(\frac{b}{g}\right)$, permettent une classification en un certain nombre de groupes physiologiques. Cette classification se retrouve assez bien dans des milieux différents, bien que les valeurs des rapports changent.

Ces auteurs distinguent 6 groupes pour lesquels les valeurs des rapports sur jus de raisin sont les suivantes :

	$b/g < 7\ \%$	$b/g > 7\ \%$
	Glycérogènes	Glycologènes
$a/s < 0{,}75$	Succinogènes	
$0{,}75 < a/s < 1{,}25$	Équilibrées	
$a/s < 1{,}25$	Acétogènes	

Ils ont étudié sur ces bases un grand nombre de levures elliptiques de vins, pour lesquelles ils ont établi les bilans complets de fermentation.

Comme ce travail n'avait été fait que dans le cas particulier des *Saccharomyces ellipsoïdeus*, il nous a paru intéressant de l'étendre à un grand nombre de levures appartenant à d'autres genres et espèces : *Kloeckera, Hansenula, Torulopsis, Candida, Saccharomycodes, Hanseniaspora, Pichia*, etc.

Les souches nous ont été fournies par des laboratoires spécialisés dans l'étude des levures, notamment ceux de T. CASTELLI à Pérouse et le « Centraalbureau voor Schimmelcultures » à Delft. Un grand nombre de souches proviennent de la collection de la Station œnologique et ont été isolées des moûts et des vins de la Gironde (108).

Les levures à fort pouvoir fermentatif ont été étudiées sur moût de raisin de 14 à 16° Baumé, préalablement désulfité, alors que les levures moins alcoogènes *Kloeckera, Hansenula, Hanseniaspora*, etc., fermentaient sur moût de raisin dilué à 6 ou 7° Baumé et conservé par pasteurisation. Les milieux étaient ensemencés à l'aide d'une culture de levures en milieu liquide de façon à amener le taux de levures à 100 cellules par mm^3. Ces levures sont conservées au laboratoire et repiquées tous les deux mois alternativement sur milieu solide (moût de bière amené à pH 7 et additionné de 20 grammes par litre de gélose) et sur milieu liquide constitué par du moût de raisin stérilisé.

Les fermentations ont toujours été conduites dans deux conditions d'aération (118). Dans un cas, le moût était mis à fermenter dans des flacons bouchés d'un tampon d'ouate assez serré ; l'ouate permet la pénétration de l'air et réalise des conditions d'aérobiose ménagée permettant le développement actif des levures. Dans l'autre cas, des flacons identiques étaient bouchés par un bouchon de liège paraffiné traversé d'un tube de verre finement effilé à son extrémité supérieure et rempli d'ouate dans sa partie large. De cette façon, le gaz carbonique de fermentation s'accumule dans la partie supérieure du flacon et le gaz qui s'échappe de manière continue par le tube effilé, empêche toute pénétration d'air. La fermentation se poursuit en anaérobiose, du moins tant que le dégagement du gaz carbonique est suffisant. Avec certaines levures, telles que les *Torulopsis* et les *Hansenula* qui fermentent lentement, la rentrée d'air est suffisante pour permettre des phénomènes oxydatifs ; il n'y a plus anaérobiose complète.

Les fermentations avaient lieu dans une étuve maintenue à 25°-26°C et duraient un mois environ. Après ce temps, on dosait les produits secondaires dans le liquide séparé du dépôt par décantation.

Les résultats obtenus, dont quelques-uns ont été déjà publiés (110), nous ont permis de dresser les tableaux IV, V et VI. Plusieurs dizaines de bilans ayant été ainsi établis, nous ne pouvons en donner que quelques exemples. Dans ces tableaux, mis à part le degré alcoolique exprimé en volume, les chiffres représentent des millimolécules par litre, expression qui permet l'addition directe des produits secondaires pour le calcul des bilans.

I. — ÉTUDE DES SACCHAROMYCES ELLIPSOIDEUS

Les dix levures appartenant à l'espèce *Saccharomyces ellipsoïdeus* que nous avons étudiées, confirment les résultats obtenus par GENEVOIS, PEYNAUD et RIBÉREAU-GAYON. Le bilan des produits secondaires donne un rapport Σ/g de l'ordre de 0,8 à 0,9 avec des extrêmes de 0,79 et 0,98. On peut donc dire qu'on connaît les produits secondaires que forment ces levures à 10 p. 100 près ou, dans les conditions les moins bonnes, à 20 p. 100 près. Les taux de chacun de ces produits sont variables d'une levure à l'autre et avec les conditions d'aération. Ainsi, en présence d'air il se forme davantage d'acide succinique, d'acétoïne et généralement de glycérol ; par contre, il y a plus d'acide acétique en milieu non aéré.

La fermentation va généralement plus loin en présence d'air ; il se fait davantage d'alcool en milieu aéré. Cette différence est très forte pour la levure 81 qui donne 15°1 en aérobiose et 8°1 seulement en flacon bouché d'un tube effilé. Par contre, la levure 89 est capable de former autant d'alcool dans les deux conditions.

Lorsqu'on calcule le rendement en alcool à partir du sucre, on trouve qu'il a fallu en moyenne 18 g de sucre pour former un degré d'alcool ; c'est un rendement faible, peut-être dû à la grande richesse en sucre du moût au départ.

Le rendement en alcool dépend évidemment de la proportion de la fermentation glycéropyruvique ; on peut représenter cette proportion par le rapport $x = \frac{\text{glycérol}}{\text{sucre fermenté}}$, ces produits étant exprimés en millimolécules. Ceci signifie que sur 100 mmol de sucre fermenté, x mmol subissent la fermentation glycéropyruvique. On trouve pour ces levures elliptiques des proportions variant de 5 à 13 p. 100, les chiffres les plus courants étant aux environs de 7,5 p. 100. La quantité de sucre fermenté influe beaucoup sur ce rapport et il est d'autant plus grand qu'il y a moins de sucre fermenté. Par exemple, la fermentation glycéropyruvique apparaît proportionnellement plus importante à l'abri de l'air qu'à l'air ; ceci est logique puisque la plus grande partie du glycérol se forme pendant la phase d'induction de la fermentation alcoolique.

Nous avons calculé pour ces levures les rapports a/s et $(b + m)/g$, afin de leur appliquer la classification schématisée par le tableau de la page 175.

Nous trouvons comme levure succinogène-glycérogène la levure n° 81, toutes les autres levures du tableau IV se classant comme levures acétogènes et glycologènes. La première est donc riche en enzyme de condensation succinique, mais pauvre en la diastase responsable de la condensation acétoïnique. Les autres ont au contraire relativement beaucoup d'aldéhydomutase qui conditionne la formation d'acide acétique.

Cette classification a, bien entendu, une grande part d'arbitraire, puisque ces rapports varient avec le milieu et les conditions de fermentation. Par exemple, l'aération diminue l'acide acétique et augmente l'acide succinique, vraisemblablement du reste en modifiant le taux de l'enzyme de condensation succinique.

Les *Saccharomyces ellipsoïdeus* se caractérisent donc par un métabolisme de fermentation ($\Sigma/g < 1$). D'autre part, ils engagent à peu près tous la même proportion de sucre dans la voie glycéropyruvique et se différencient surtout par leur utilisation de l'éthanal formé.

II. — ÉTUDE DES LEVURES APPARTENANT A D'AUTRES GENRES

Les résultats obtenus avec les autres genres de levures, mises en œuvre dans les conditions expérimentales qui ont été décrites (milieu, température, aération), permettent de les classer en deux groupes :

1° Les levures qui, de même que les *Saccharomyces ellipsoïdeus*,

Tableau IV

Bilans des produits secondaires avec divers Saccharomyces ellipsoïdeus

Teneurs en mmol par litre. Moût de raisin : 16° Baumé

Levures	Conditions	Alcool	Glycérol g	Acide acétique a	Acide succinique s	2,3 butanediol b	Acétoïne m	Éthanal h	Σ	100 Σ/g	100 a/s	1 000 $(b+m)/g$	$\frac{g}{\text{sucre fermenté}}$
81 *Sacch. ellipsoïdeus*	air	15°1	*123*	5,1	18,3	8,2	0,5	1,2	*112*	91	28	67	7,6
Geisenheim I	abri de l'air	8°1	*126*	13,9	13,1	2,8	0,08	3,5	*100*	80	106	22	13,0
89 *Sacch. ellipsoïdeus*	air	13°8	*93*	13,7	8,5	9,6	0,4	1,8	*82*	88	161	103	6,5
Geisenheim II	abri de l'air	13°7	*77*	15,6	6,1	9,6	0,18	2,8	*74*	96	255	124	5,9
90 *Sacch. ellipsoïdeus*	air	14°7	*114*	23,3	6,9	13,3	0,69	2,1	*98*	86	337	116	7,2
Tokay	abri de l'air	13°3	*111*	24,5	5,7	10,4	0,2	3,5	*92*	83	430	94	8,5
70 *Sacch. ellipsoïdeus*	air	15°0	*89*	15,5	6,7	7,9	0,2	2,9	*76*	85	232	88	5,7
Portugal	abri de l'air	11°8	*85*	22,5	5,0	7,2	0,1	5,8	*83*	98	450	84	7,6
73 *Sacch. ellipsoïdeus*	air	15°0	*96*	14,9	7,0	8,1	0,2	2,7	*76*	79	212	84	6,2
Australie	abri de l'air	11°5	*95*	22,5	5,6	7,4	0,08	4,5	*85*	88	402	78	8,6
74 *Sacch. ellipsoïdeus*	air	14°7	*87*	17,8	5,9	12,0	0,27	2,5	*80*	82	302	137	5,8
Australie	abri de l'air	12°2	*114*	28,6	4,9	11,6	0,4	4,3	*98*	86	583	102	9,8
171 *Sacch. ellipsoïdeus*	air	14°0	*104*	19,2	6,2	9,7	0,2	2,6	*82*	79	309	93	7,1
Australie	abri de l'air	11°0	*93*	24,5	4,9	8,0	0,1	4,2	*86*	92	500	86	9,0
175 *Sacch. ellipsoïdeus*	air	13°9	*95*	20,4	5,7	7,9	0,16	3,0	*80*	85	358	83	6,6
Australie	abri de l'air	13°0	*94*	24,5	4,8	7,4	0,1	4,7	*85*	90	510	79	7,9
177 *Sacch. ellipsoïdeus*	air	14°4	*95*	14,9	7,3	8,9	0,16	2,4	*78*	82	204	93	6,2
Australie	abri de l'air	12°1	*95*	20,4	6,4	8,7	0,1	4,5	*86*	91	318	91	8,2
228 *Sacch. ellipsoïdeus*	air	14°5	*95*	20,4	7,0	10,3	0,14	2,9	*89*	94	291	108	6,4
Australie	abri de l'air	12°2	*86*	22,5	4,7	8,3	0,1	4,2	*81*	94	478	96	7,8

Le nombre précédant le nom de la levure est le numéro d'ordre de la collection. La somme Σ est calculée d'après la formule : $\Sigma = 5s + 2a + b + h + 2m$.

Tableau V

Bilans des produits secondaires avec diverses levures

Teneurs en mmol par litre. Moûts de raisin : 14°5 et 16° Baumé

Levures	Conditions	Alcool	Glycérol *g*	Acide acétique *a*	Acide succinique *s*	2,3 butanediol *b*	Acétoïne *m*	Éthanal *h*	Σ	100 Σ/*g*	100 *a*/*s*	1 000 (*b* + *m*)/*g*	*g* / sucre fermenté
125 *Sacch. italicus*	air	14°1	*90*	8,8	8,6	4,8	1,3	1,2	*69*	76	102	67	6,1
	abri de l'air	12°1	*64*	8,4	6,1	4,3	0,5	1,2	*54*	84	137	76	5,3
126 *Sacch. oviformis*....	air	11°7	*100*	14,1	7,3	5,7	0,9	1,4	*74*	74	193	66	8,2
	abri de l'air	9°6	*70*	15,3	6,8	5,9	0,8	1,6	*74*	104	225	96	7,1
127 *Sacch. carlsbergensis*	air	9°1	*66*	9,0	7,2	4,4	0,7	1,5	*61*	92	125	77	6,7
	abri de l'air	6°8	*56*	9,6	4,6	3,1	0,5	1,6	*48*	85	208	64	7,6
128 *Sacch. pastorianus*..	air	7°5	*68*	13,1	5,3	7,5	1,4	1,7	*65*	96	247	130	8,0
	abri de l'air	5°8	*56*	11,4	4,2	5,2	1,9	3,1	*56*	100	270	126	8,7
129 *Sacch. uvarum*	air	9°1	*86*	8,4	9,8	8,2	0,7	1,3	*77*	90	85	104	8,6
	abri de l'air	7°1	*72*	12,0	5,7	7,2	3,3	3,8	*70*	97	210	148	9,1
99 *Saccharomycodes bisporus*	air	13°5	*132*	18,8	10,5	9,0	1,1	4,3	*106*	80	178	76	9,1
	abri de l'air	10°6	*89*	11,5	9,5	3,0	2,4	2,2	*80*	90	121	60	9,3
100 *Saccharomycodes ludwigii*	air	10°7	*99*	11,0	10,2	3,4	4,2	1,2	*78*	79	116	77	8,4
	abri de l'air	10°7	*84*	10,8	10,5	2,7	3,1	2,3	*79*	94	102	69	8,6
87 *Zygosaccharomyces polymorphus*	air	12°9	*96*	13,7	8,6	9,6	4,1	1,5	*82*	86	159	143	6,8
	abri de l'air	14°3	*97*	18,4	8,2	7,6	1,0	4,4	*90*	93	224	88	6,9
101 *Torulaspora rosei* ..	air	11°0	*85*	10,1	6,9	8,6	0,2	3,7	*67*	79	146	103	7,2
	abri de l'air	12°7	*85*	10,9	5,7	4,4	0,1	4,3	*59*	70	191	52	7,0
130 *Torulaspora delbrueckii*	air	9°2	*67*	2,0	10,9	5,1	1,4	1,8	*67*	99	19	97	6,4
	abri de l'air	4°3	*49*	1,2	6,5	2,6	1,3	0,8	*41*	85	19	80	8,3
85 *Torulaspora lactis* (1)	air	8°0	*50*	21,0	5,2	6,5	0,1	1,8	*76*	153		132	5,7
	abri de l'air	5°1	*52*	14,7	6,2	3,3	0,1	4,4	*68*	131		63	8,2
88 *Torulopsis Meissner* (1).	air	12°9	*100*	36,2	7,1	14,9	0,5	2,7	*126*	126		154	7,1
	abri de l'air	9°5	*111*	47,0	6,4	8,7	0,2	6,5	*142*	127		80	10,2

Tableau VI

Bilans des produits secondaires avec diverses levures (Suite)

Moûts de raisin : 6° et 6°8 Baumé — Teneurs en mmol par litre

Levures	Conditions	Alcool	Glycérol g	Acide acétique a	Acide succinique s	2,3-butanediol b	Acétoïne m	Éthanal h	Σ	100 Σ/g	100 a/s	1 000 $(b+m)/g$	$\frac{g}{\text{sucre fermenté}}$
83 *Kloeckera apiculata*(1)	air	5°1	*59*	4,9	5,5	1,8	0,1	7,7	*47*	80	89	31	10,2
Geisenheim I	abri de l'air	5°7	*47*	4,9	3,9	1,2	0,1	3,2	*34*	72	125	25	8,2
84 *Kloeckera apiculata*(1)	air	5°0	*58*	5,5	5,5	1,9	0,1	7,3	*48*	83	100	33	10,1
Geisenheim II	abri de l'air	5°7	*49*	4,7	4,5	1,1	0,1	2,5	*36*	71	104	17	8,5
103 *Kloeckera apiculata*	air	6°1	*47*	36,8	5,5	3,2	0,2	5,1	*110*	234		72	7,3
Pouilles	abri de l'air	6°8	*56*	9,9	4,3	2,0	0,2	3,9	*48*	85	230	39	8,3
104 *Kloeckera africana* .	air	6°1	*66*	20,3	7,5	3,6	2,1	7,2	*93*	141		86	10,0
	abri de l'air	4°2	*64*	16,9	4,4	1,0	1,0	2,3	*53*	83	384	31	13,5
102 *Kloeckera magna* ...	air	5°6	*62*	51,0	6,3	3,0	3,3	4,3	*147*	238		101	9,8
	abri de l'air	6°7	*62*	13,8	5,9	3,3	0,1	4,4	*60*	96	234	54	9,2
136 *Kloeckeraspora uvarum*	air	3°6	*58*	23,7	4,0	1,6	2,2	0,8	*74*	128		65	13,0
	abri de l'air	3°4	*54*	15,3	3,8	1,2	1,7	1,1	*55*	103	400	53	12,8
106 *Hanseniaspora apuliensis*	air	6°0	*69*	26,5	5,9	4,4	0,6	7,7	*96*	139		72	10,3
	abri de l'air	6°2	*77*	12,1	4,5	2,3	0,4	7,2	*57*	74	268	35	11,5
107 *Hanseniaspora guillermondii*.....	air	5°8	*53*	18,1	5,4	1,0	2,7	4,4	*74*	139		67	9,8
	abri de l'air	6°1	*89*	19,2	5,6	2,6	1,1	3,5	*75*	83	342	41	12,8
112 *Hansenula nivea*....	air	1°4	*23*	74,3	3,9	1,5	0,1	0,5	*170*	740		69	4,1
	abri de l'air	3°3	*17*	69,0	3,9	2,5	0,2	0,5	*161*	945		158	4,5
113 *Hansenula fermentans*	air	0°9	*32*	70,1	5,9	1,6	0,1	0,3	*172*	537		54	5,8
	abri de l'air	4°0	*27*	43,8	4,5	1,6	0,1	0,4	*112*	416		62	5,6

Le nombre précédant le nom de la levure est le numéro d'ordre de la collection. La somme Σ est calculée d'après la formule :

$$\Sigma = 5s + 2a + b + h + 2m.$$

(1) Cette levure nous a été fournie sous cette dénomination par le Professeur SCHANDERL de Geisenheim.

satisfont au bilan des produits secondaires (nous le constatons dans les deux conditions d'aération) et pour lesquelles le rapport Σ/g est de l'ordre de 0,8 à 0,9. Nous trouvons dans ce groupe tous les *Saccharomyces*, en plus des *Saccharomyces ellipsoïdeus*, ainsi que *Saccharomycodes bisporus* et *Saccharomycodes ludwigii*, *Zygosaccharomyces polymorphus*, *Torulaspora rosei* et *Torulaspora delbrueckii*, les deux levures 83 et 84 étiquetées *Kloeckera apiculata* I et II (les cultures de ces deux levures n'ont pas toujours la forme apiculée et elles donnent beaucoup moins d'acidité volatile que les autres *Kloeckera*).

Toutes ces levures ont, comme les levures elliptiques, un métabolisme fermentatif.

2° Les levures pour lesquelles le bilan des produits secondaires n'est pas correct. On le constate dans les deux conditions d'aération ; même dans les flacons fermés par des bouchons à tube effilé, une très légère pénétration d'air intervient lorsque la fermentation est lente. Σ est ici toujours très supérieur à g. Ce sont *Torulaspora lactis*, *Torulopsis Meissner*, *Hansenula nivea*, assimilée par Lodder à *Hansenula anomala*, *Hansenula fermentans*.

La *Torulaspora* et la *Torulopsis* peuvent former une assez grande quantité d'alcool, jusqu'à 12°9 pour *Torulopsis Meissner* ; les *Hansenula* au contraire, ne forment des quantités appréciables d'alcool qu'à l'abri de l'air et illustrent la remarque de MEYERHOF (75) : « L'intensité de fermentation aérobie est d'autant plus inférieure à l'intensité de fermentation anaérobie que la levure est plus riche en ferment respiratoire. » Elles forment des quantités importantes d'acide acétique, qui n'est pas entièrement d'origine fermentative. Il y a en même temps respiration et intervention des déhydrases oxytropes, des oxydases et des cytochromes. Le bilan des produits secondaires n'est plus correct, car ces produits ne sont plus formés alors par la seule fermentation.

Entre ces deux groupes bien caractérisés se situent des levures qui vérifient le bilan des produits secondaires en anaérobiose (d'ailleurs relative nous le savons) et ne le vérifient plus en milieu aéré. Ce groupe comprend toutes les *Kloeckera* (sauf les n° 83 et 84), *Kloeckeraspora uvarum* et les *Hanseniaspora*. Au contact de l'air elles forment de l'acide acétique par voie oxydative. A l'abri de l'air, elles sont uniquement fermentatives. Elles ont un pouvoir alcoogène assez faible.

Nous avons donc distingué les levures d'après les intensités respectives de la fermentation et de la respiration, et nous avons vu que l'intensité respiratoire est très variable d'une levure à l'autre. En d'autres termes, certaines levures sont nettement plus riches en enzymes respiratoires. Les expériences d'EPHRUSSI et SLONIMSKI tendent à rapprocher ces enzymes des enzymes adaptatifs et remettent en question leur caractère d'enzymes constitutifs typiques. En l'absence d'enzyme res-

piratoire, la fermentation aérobie peut être aussi forte que la fermentation anaérobie ; en effet SLONIMSKI et HIRSCH (131) ont montré qu'un mutant de *Saccharomyces cerevisiae* caractérisé par l'absence complète de respiration sensible au cyanure de potassium, présente une fermentation aérobie aussi forte que la fermentation anaérobie et est dépourvu des cytochromes a et b, de la cytochrome-oxydase et de la déshydrogénase succinique. Presque tous les enzymes respiratoires ont été affectés par la mutation.

Ce sont donc la présence et le taux des enzymes respiratoires présents chez chaque race de levure qui conditionnent la part de la respiration, donc en définitive la composition du liquide fermenté.

Remarque. — Certains auteurs ont fait remarquer que les levures apiculées avaient un rendement en alcool inférieur à celui des levures elliptiques, puisqu'il leur faut 21 et 22 g de sucre pour former un degré d'alcool ; ceci signifierait qu'elles engagent une plus forte proportion de sucre dans la fermentation glycéropyruvique. Or, nous trouvons ici des chiffres du même ordre que pour les levures elliptiques, si nous prenons soin de faire fermenter ces levures à l'abri de l'air et de faire la comparaison au même degré d'alcool formé. En effet, le taux de la fermentation glycéropyruvique est d'autant plus élevé, donc le rendement en alcool est d'autant plus faible, qu'il y a moins de sucre fermenté. Si l'on tient compte de ce facteur, on constate que le taux de la fermentation glycéropyruvique varie très peu d'une levure à l'autre quel qu'en soit le genre. Les levures apiculées ne montrent un rendement en alcool plus faible que parce qu'elles sont moins alcoogènes.

Ainsi toutes les levures fermentent environ la même proportion de sucre suivant le schéma de GAY-LUSSAC et suivant le schéma de NEUBERG. Mais elles se différencient surtout par l'utilisation qu'elles font de l'éthanal, comme l'exprime la considération des rapports a/s et b/g.

Rapports a/s et b/g. Si l'on veut calculer pour ces levures les rapports a/s et b/g, il faut dans le cas des levures à métabolisme oxydatif faire la discrimination entre l'acide acétique de fermentation et l'acide acétique de respiration. On peut avoir une idée de l'ordre de grandeur du premier par le calcul suivant. De la formule $5s + 2a_f + b + h + 2m = \Sigma = 0{,}9\,g$, on déduit la valeur de a_f :

$$a_f = \frac{\Sigma - (5s + b + 2m + h)}{2}$$

$$a_f = \frac{0{,}9g - (5s + b + h + 2m)}{2}$$

Appliqués aux données analytiques des tableaux V et VI, ces calculs donnent les résultats du tableau VII.

On trouve pour les *Hansenula* $5s$ égal ou supérieur à g ; il faut donc

TABLEAU VII

Calcul de l'acide acétique de fermentation formé par les levures oxydatives

Teneurs en mmol par litre

	Conditions de fermentation	Acide acétique total	Acide acétique de fermentation	Acide acétique de respiration	100 *a/s*
85 *Torulaspora lactis*..	air	21,0	5,2	15,8	100
	abri de l'air	14,7	4,0	10,7	65
88 *Torulopsis Meissner*	air	36,2	22,9	13,3	323
	abri de l'air	47,0	26,1	20,9	408
112 *Hansenula nivea* .	air	74,3	0	74,3	—
	abri de l'air	69,0	0	69,0	—
113 *Hansenula fermentans*.....	air	70,1	0	70,1	—
	abri de l'air	43,8	0	43,8	—
103 *Kloeckera apiculata*	air	36,8	3,0	33,8	55
104 *Kloeckera africana*.	air	20,3	3,2	17,1	43
102 *Kloeckera magna*..	air	51,0	8,3	42,7	132
136 *Kloeckeraspora uvarum*.....	air	23,7	12,7	11,0	317
106 *Hanseniaspora apuliensis*	air	26,5	12,1	14,4	205
107 *Hanseniaspora guillermondii*	air	18,1	4,9	13,2	91

nécessairement admettre que dans ce cas, il y a une formation d'acide succinique par oxydation :

$$2CH_3COOH \xrightarrow{O} COOH - CH_2 - CH_2 - COOH + H_2O.$$

L'acide acétique de fermentation calculé ci-dessus est en général assez faible et de l'ordre de grandeur du taux formé habituellement par les levures elliptiques. On ne peut donc pas dire en règle générale que l'intervention des apiculées se distingue de celle des elliptiques par une acidité volatile plus élevée. Il faut également faire ici la même remarque qu'en ce qui concerne le taux de fermentation glycéropyruvique : la plus grande partie de l'acide acétique se forme avec les 4 ou 5 premiers degrés d'alcool et on doit en tenir compte dans la comparaison.

ANTONIANI avait déjà mesuré pour les *Kloeckera*, l'acide acétique de fermentation en inhibant la respiration par le cyanure de potassium (7). Il trouvait également que l'acide acétique de dismutation est du même ordre de grandeur que pour les *Saccharomyces* et en concluait que la formation d'acide acétique d'origine oxydative est une propriété caractéristique de certaines levures non elliptiques.

Le calcul des rapports *a/s* et *b/g* pour toutes ces races de levures nous donne le classement suivant, en envisageant seulement les fermentations conduites dans les conditions les plus anaérobies.

	Succinogènes	Équilibrées	Acétogènes
Glycérogènes	*Torulaspora lactis*	*Sacch. italicus* *K. apiculata 83* *K. apiculata 84* *Sacch. ludwigii*	*Sacch. carlsbergensis* *Kloeckeraspora uvarum* *Saccharomycodes bisporus* *Torulaspora rosei* *K. apiculata 103* *K. africana* *K. magna* *Hanseniaspora apuliensis* *Hanseniaspora guillermondii*
Glycologènes	*Torulaspora delbrueckii*		*Sacch. pastorianus* *Sacch. uvarum* *Sacch. oviformis* *Zygo. polymorphus* *Torulopsis Meissner*

On remarquera cependant que ces rapports varient beaucoup avec les conditions de fermentation et qu'ils ne constituent pas une base rigoureuse de classification. Les conditions d'aération modifient profondément le stock enzymatique de la levure. Ceci est en accord avec les travaux d'Ephrussi et Slonimski (130) qui ont montré sur *Saccharomyces cerevisiae* que la modification des conditions d'aération introduit des variations qualitatives et quantitatives très importantes, non seulement du système des enzymes respiratoires, mais aussi des autres diastases.

III. — LA CLASSIFICATION D'ANTONIANI

Un autre mode de classification a été proposé par Antoniani qui répartit les levures en trois groupes d'après leur « pouvoir ferment », défini comme « l'aptitude de la levure à dégrader la molécule glucidique exclusivement par une activité déshydrogénante anaérobie, sans aucune aide énergétique d'un processus oxydatif du type respiratoire, impliquant une intervention finale d'oxygène libre » (5). Il prend comme critère de mesure du « pouvoir ferment » l'intensité respiratoire, le potentiel d'oxydoréduction et la formation d'acétoïne ou de 2,3-butanediol. Il distingue ainsi : 1° les levures à bas pouvoir ferment, à forte intensité respiratoire, qui travaillent à un potentiel élevé et accumulent exclusivement de l'acétoïne ; 2° les levures à haut pouvoir ferment dont l'intensité respiratoire est faible, qui travaillent à un potentiel bas et forment uniquement du butanediol ; 3° les levures plus rares à pouvoir ferment moyen caractérisées par la présence simultanée d'acétoïne et de 2,3 butanediol.

Nous constatons que toutes les levures que nous avons essayées forment simultanément de l'acétoïne et du 2,3-butanediol en proportions d'ailleurs très différentes. Ceci a été confirmé par ANDRÉ et DUPUY (4). Si on les sépare en deux groupes d'après le pourcentage d'acétoïne qu'elles forment par rapport à la somme de 2,3 butanediol-acétoïne, on retrouve dans les grandes lignes les résultats d'ANTONIANI (6), mais il n'y a pas forcément une relation entre la formation d'acétoïne et l'intensité de la respiration ; ainsi les *Torulopsis* à forte intensité respiratoire ne forment que 2 à 3 p. 100 d'acétoïne ; au contraire, les *Saccharomycodes* à faible intensité respiratoire donnent beaucoup d'acétoïne. La corrélation entre la production d'acétoïne et d'acide acétique signalée par CASTELLI dans deux publications (16) n'est pas non plus générale et comme il l'a noté lui-même, cette corrélation n'existe pas pour toutes les races.

Nous consacrons le chapitre VII à l'étude de la formation des corps butanedioliques. Notons seulement ici qu'il ne paraît pas possible d'utiliser leur présence comme une base de classification rigoureuse des levures, de même qu'il est difficile de relier la teneur en l'un de ces corps au potentiel d'oxydoréduction du liquide ou au taux d'un autre produit.

IV. — CONCLUSIONS

En définitive, si la connaissance du taux des produits secondaires formés par une levure permet d'envisager un classement, ce taux est la plupart du temps trop variable suivant les milieux et les conditions pour que cette classification ait la valeur des tests physiologiques habituels. Elle ne peut guère s'appliquer qu'à la notion de race dans le cadre de l'espèce, et comme l'expriment E. PEYNAUD et S. DOMERCQ (108) : « Si l'on peut baser une classification physiologique sur la présence ou l'absence de tel enzyme (invertase, α galactosidase, par exemple, permettant à la levure l'utilisation d'un sucre donné), il est difficile d'envisager une classification reposant sur le taux d'un enzyme (ferment respiratoire, enzyme de condensation de l'acide succinique ou butanediolique), car ce taux est également fonction du milieu et des conditions de travail de la levure. »

Il n'en reste pas moins que la connaissance des taux de formation des produits secondaires par une levure présente un grand intérêt pour sa caractérisation et que la description d'une levure devrait s'accompagner de ces données.

En ce qui concerne la façon dont les diverses levures transforment le sucre par voie fermentative, les présents documents analytiques aboutissent à la notion d'une certaine unité.

Chapitre III

INFLUENCE DES CONDITIONS DE LA FERMENTATION SUR LA FORMATION DES PRODUITS SECONDAIRES

On a reconnu depuis longtemps que la formation des différents produits secondaires était affectée par les conditions de la fermentation. Nous avons donc entrepris l'étude systématique de l'influence de chacune de ces conditions, conditions extérieures et conditions de milieu, et nous avons fait varier successivement : l'aération, la concentration en ions hydrogène, la température, la nature du milieu, la teneur en facteurs de croissance, la richesse en sucre ; nous avons également étudié l'action d'un activeur de fermentation d'origine fongique.

I. — INFLUENCE DE L'AÉRATION

Nous avons déterminé les modifications apportées par l'aération à la formation des produits secondaires avec deux *Saccharomyces ellipsoïdeus*. Ces levures ont fermenté un moût de raisin de 12° Baumé dans une étuve à 26°C. Les dispositifs d'obturation employés et les différentes conditions d'aération ont été les suivants :

a) Bouchon de liège paraffiné traversé par un tube de verre coudé plongeant dans le mercure ; dans ces conditions, la pénétration d'air est impossible.

b) Bouchon de liège paraffiné traversé d'un tube de verre finement effilé à son extrémité supérieure et bourré d'ouate dans sa partie large. Le dégagement du gaz par le tube effilé empêche la pénétration d'air au moins pendant la phase la plus active de la fermentation.

c) Tampon d'ouate réalisant des conditions d'aérobiose ménagée.

d) Tampon d'ouate et aération quotidienne par agitation pendant une minute en présence d'air.

e) Tampon d'ouate et barbotage quotidien d'oxygène pendant une heure.

Il n'est pas possible de chiffrer exactement les consommations d'oxygène dans ces différentes conditions, mais on a ainsi réalisé une gamme d'aération d'intensité croissante.

A la fin de la fermentation on a décanté le liquide et on a dosé les produits secondaires. Les résultats obtenus sont consignés dans le tableau VIII.

Le calcul de la somme $\Sigma = 5s + 2a + b + h + 2m$ nous montre que la relation $\Sigma = 0{,}8$ à $0{,}9$ g se vérifie de manière satisfaisante dans

Tableau VIII

Influence de l'aération sur la formation des produits secondaires

Teneurs en mmol par litre. Le sucre est exprimé en g

	Conditions d'aération	Alcool	Glycérol *g*	Acide acétique *a*	Acide succinique *s*	Acétoïne *m*	2,3-butanediol *b*	Éthanal *h*	Σ	100 Σ/*g*	100 *a*/*s*	1 000 (*b* + *m*)/*g*
81. *Sacch. ellipsoïdeus* Geisenheim	Barboteur	10°4	*79*	11,6	6,9	0,6	7,9	0,8	*68*	86	168	108
	Tube effilé	10°8	*74*	8,6	6,0	0,5	6,1	1,4	*56*	76	143	89
	Ouate	12°0	*84*	7,5	8,9	0,5	6,1	1,2	*68*	81	84	79
	Aération	12°0	*90*	7,3	9,6	0,4	6,1	1,6	*71*	79	76	72
	Barbotage d'oxygène	12°0	*88*	6,7	9,5	0,5	6,2	1,2	*69*	79	70	76
41. *Sacch. ellipsoïdeus* Sauternes	Barboteur	8°8	*72*	16,1	4,9	0,8	5,9	0,8	*65*	91	328	93
	Tube effilé	11°4	*71*	16,7	5,6	0,6	5,4	0,7	*69*	97	298	84
	Ouate	11°9	*79*	9,4	8,4	0,6	4,6	1,3	*68*	86	112	66
	Aération	12°1	*83*	10,6	9,3	0,6	5,2	3,5	*78*	94	114	70
	Barbotage d'oxygène	11°8	*80*	10,0	9,5	0,5	4,8	3,0	*76*	95	105	66

tous les cas. Même en milieu aéré le métabolisme reste uniquement fermentatif et il n'y a pas intervention des diastases d'oxydation.

La fermentation du sucre va toujours nettement plus loin en présence d'air et il se forme davantage d'alcool. Il se fait aussi toujours davantage de glycérol en milieu aéré, mais le rapport $\frac{\text{glycérol}}{\text{sucre fermenté}}$ qui représente la proportion de la fermentation glycéropyruvique, ne varie pas beaucoup. L'aération a finalement peu d'incidence sur la proportion de sucre qui suit la voie de la transformation glycéropyruvique.

La production d'acide succinique est toujours nettement augmentée par l'aération, alors que le taux d'acide acétique est au contraire diminué, sans qu'il soit possible d'ailleurs d'établir une relation quantitative entre ces variations opposées. Les modifications des teneurs en enzymes avec les conditions d'aération, auxquelles il a été fait allusion dans le chapitre précédent, par un phénomène analogue à celui qui a été mis en évidence par SLONIMSKI (130), sont certainement responsables des variations dans les teneurs en produits secondaires.

Cet auteur a montré par exemple que la teneur en cytochrome-oxydase ou en déshydrogénase lactique est diminuée plusieurs centaines de fois dans la fermentation anaérobie. La présence d'oxygène induit la synthèse de ces enzymes et à des états d'aération intermédiaires correspondent des compositions enzymatiques intermédiaires. On pourrait ainsi expliquer, par analogie, l'augmentation du taux d'acide succinique formé, constatée en milieu aéré, par la formation plus importante chez la levure aérée de l'enzyme qui provoque la condensation de l'éthanal en acide succinique.

La formation plus élevée d'acide acétique à l'abri complet de l'air est en opposition avec la thèse selon laquelle l'acide acétique de fermentation se formerait uniquement par oxydation de l'alcool par les déshydrogénases de la levure (49).

La teneur en produits acétoïniques se montre légèrement plus forte en anaérobiose, mais nous n'observons pas une variation systématique de l'acétoïne. Cependant, STAHLY et WERKMAN (132) ont suggéré qu'acétoïne et 2,3-butanediol forment un système réversible d'oxydoréduction. Nous reviendrons d'ailleurs dans le chapitre VII sur le cas des produits butanedioliques.

L'aération en cours de fermentation est donc un des facteurs importants agissant sur la formation des produits secondaires. Même pour des levures présentant de faibles intensités respiratoires, la plus ou moins grande aération du milieu a sa répercussion sur l'utilisation de l'éthanal par la levure. Tout incline à penser que la levure se multipliant au contact de l'air possède un stock enzymatique beaucoup plus abondant que celle qui végète à l'abri complet de l'oxygène. Le taux des produits secon-

daires formés, sinon le taux de la fermentation glycéropyruvique, est donc assez profondément modifié suivant l'importance de l'aération du milieu qui fermente.

II. — INFLUENCE DE LA CONCENTRATION EN IONS H^+

STRAUB (134) et LABORDE avaient remarqué que l'acidité de la solution nutritive exerçait une influence sur la production de glycérol. STRAUB indiquait que le glycérol augmente quand l'acidité diminue, LABORDE trouvait au contraire que la proportion de glycérol augmente avec l'acidité. Mais ces auteurs envisageaient seulement l'acidité de titration et ne pouvaient faire appel à la notion d'acidité réelle, inconnue à cette époque.

On a vu que NEUBERG et ses collaborateurs ayant observé que la fermentation était profondément modifiée en milieu alcalin et qu'il se formait davantage d'acide acétique et de glycérol, avaient expliqué ces modifications par l'existence d'une fermentation glycéroacétique du sucre, dont la proportion augmente quand le pH s'élève.

E. PEYNAUD (103) a étudié plus particulièrement la production d'acide acétique en fonction du pH et montré qu'elle passe par un minimum aux environs de pH 3,5 — 4,5 pour devenir une fonction linéaire du sucre fermenté vers pH 7,5.

Il nous a donc paru intéressant d'étudier les variations de tous les produits secondaires avec la concentration en ions H^+ et de voir si l'équation de GENEVOIS se vérifiait aussi en milieu très acide ou très alcalin (67).

Nous avons fait fermenter à 25°C un moût de raisin de 12° Baumé dans les deux conditions d'aération habituelles : obturation par l'ouate et par un tube effilé suivant le dispositif déjà décrit. Dans cette expérience et dans les suivantes, nous avons utilisé une levure *Saccharomyces ellipsoïdeus* ; dans ce cas, la fermentation est active et nos techniques expérimentales correspondent à des conditions nettement distinctes d'aérobiose et d'anaérobiose. Nous pourrons donc employer ces termes dans l'étude qui suit.

Nos essais ont porté sur six conditions différentes de pH : 2,6 ; 3,0 ; 5,0 ; 5,65 (obtenu par addition de carbonate de calcium) ; 7,0 et 8,0, ces deux dernières valeurs étant maintenues par additions répétées de solution de soude au cours de la fermentation.

Le tableau IX expose les résultats obtenus. Nous constatons que la concentration en ions hydrogène a une grande influence sur la formation de tous les produits secondaires et aussi sur l'allure de la fermentation. C'est aux pH acides, généralement vers pH 3,0 que la production d'alcool

Tableau IX

Influence du pH sur la formation des produits secondaires

Moût de 12° B fermenté par *Sacch. ellipsoïdeus* n° 41

Teneurs en mmol par litre. Le sucre est exprimé en g.

pH initial	pH final	Sucre restant	Alcool	Alcool total	Glycérol *g*	Acide acétique *a*	Acide succinique *s*	Acétoïne *m*	2,3-butanediol *b*	Éthanal *h*	Σ	100 Σ/*g*	100 *a*/*s*	1 000 (*b* + *m*)/*g*
						Aérobiose								
2,6	2,80	4,7	11°3	11°6	*85*	15,2	8,9	1,4	5,7	1,5	*85*	100	171	83
3,0	3,15	4,0	12°3	12°5	*78*	11,8	8,4	1,0	5,5	0,8	*74*	94	140	83
5,0	4,29	4,5	11°4	11°6	*82*	17,6	8,1	0,7	5,5	2,9	*85*	103	218	76
5,65	5,65	7,8	11°0	11°4	*96*	27,4	11,0	0,6	4,2	0,9	*116*	120	248	50
7,0	8,35	4,3	9°6	9°9	*189*	70,0	14,8	0,7	7,2	1,1	*224*	118	472	42
8,0	9,10	4,0	8°9	9°1	*224*	105	12,1	0,5	6,1	1,2	*279*	124	872	29
						Anaérobiose								
2,6	2,77	79,5	7°9	12°3	*83*	18,8	5,0	1,7	5,7	1,2	*73*	88	376	89
3,0	3,22	61	8°9	12°3	*84*	16,6	6,3	1,0	7,2	1,0	*75*	90	264	98
5,0	4,53	26,5	10°7	12°1	*80*	16,4	6,3	0,8	7,2	1,1	*74*	93	260	100
5,65	5,83	57	8°7	11°9	*112*	31,9	5,6	0,7	6,3	1,3	*101*	86	570	62
7,0	7,61	4,9	10°9	11°1	*169*	53,1	9,3	0,5	4,8	1,0	*159*	94	570	31
8,0	7,77	5,4	10°4	10°7	*209*	80,5	10,1	0,5	4,1	1,0	*216*	103	800	22

est la plus grande. Pour faire la comparaison, il faut bien entendu considérer l'alcool total, obtenu en ajoutant à l'alcool trouvé celui qui correspond au sucre non fermenté, sur la base de 18 g de sucre pour 1° d'alcool. La production d'alcool diminue à mesure que le pH s'élève au-dessus de 3,0.

La production du glycérol suit une marche inverse ; elle est minimum à pH 3,0 — 5,0 et augmente rapidement au-dessus de pH 5,65. Le taux d'acide acétique passe lui aussi par un minimum pour pH 3,0 — 5,0 et augmente beaucoup en milieu alcalin. Ces résultats sont en accord avec les observations de NEUBERG et de PEYNAUD et, plus récemment, de NEISH et BACKWOOD (82). La proportion de la fermentation glycéroacétique augmentant avec le pH (la carboxylase est en effet moins active en milieu alcalin), la quantité de sucre engagé dans la fermentation de GAY-LUSSAC et par suite le rendement en alcool, diminuent.

L'augmentation du pH favorise la production d'acide succinique. Sa teneur double en anaérobiose lorsqu'on passe de pH 2,6 à pH 8,0. Mais l'acide succinique augmente beaucoup moins rapidement que le taux d'acide acétique : le rapport a/s passe par un minimum à pH 3,0 et ne cesse d'augmenter jusqu'à pH 8,0.

La teneur en acétoïne diminue quand le pH augmente ; le 2,3-butanediol varie dans le même sens au-dessus de pH 5,0, surtout en anaérobiose. La diminution est beaucoup plus nette lorsqu'on considère le rapport des produits acétoïniques au glycérol : le rendement est alors trois ou quatre fois plus faible à pH 7 ou 8 qu'à pH 3,0. ANDRÉ et DUPUY (4) ont observé la même évolution en comparant des fermentations à pH 3 et 4,95.

L'équation des produits secondaires se vérifie bien à l'abri de l'air et jusqu'à pH 5 en aérobiose. Aux pH élevés, en flacons bouchés d'ouate, les réactions d'oxydation sont favorisées et sont à l'origine de la formation d'une partie de l'acide acétique.

La concentration en ions H^+ est donc un facteur très important agissant sur la formation des produits secondaires. Aux pH élevés, une plus grande proportion de sucre s'engage dans la fermentation glycéroacétique au détriment de la voie normale de GAY-LUSSAC ; de plus les réactions d'oxydation sont favorisées. Ce terme de fermentation glycéroacétique est bien exact : ce sont précisément le glycérol et l'acide acétique qui subissent les augmentations les plus fortes ; l'acide succinique est augmenté de manière plus faible, tandis que les produits butanedioliques ont tendance à diminuer.

Il importe de souligner qu'en anaérobiose la variation de Σ suit celle de g (c'est-à-dire que la somme des produits secondaires calculée d'après l'équation de L. GENEVOIS continue à être équivalente au glycérol), même pour de grandes variations du taux de ce dernier ; ce fait est un argument probant en faveur des équations globales adoptées pour la formation des produits secondaires.

III. — INFLUENCE DE LA TEMPÉRATURE

L'influence de la température sur la formation des produits secondaires a été étudiée par plusieurs expérimentateurs qui ont donné des résultats assez contradictoires. LABORDE (64) a trouvé que le glycérol augmente généralement avec la température, les différentes races de levures se conduisant de façon variée. Mais STRAUB, KULISCH et KAUSCHKE ont affirmé au contraire que le glycérol diminue quand la température augmente et MACH et PORTELE trouvent plus de glycérol et d'acide succinique à 12° ou 15°C qu'à 25°C (134). L. GENEVOIS (32) a souligné qu'il se forme plus d'acide acétique à 7°C qu'à 20°C. CASTELLI (16) a remarqué que la température optimum pour la production d'alcool dépend de la race de la levure et que les quantités d'acide acétique formées sont en général plutôt faibles aux basses températures.

Récemment RANKINE (116) a observé pour plusieurs souches de levures que la production de glycérol était toujours plus élevée à 25°C qu'à 15°C, tandis que pour la formation d'acide acétique, le comportement des levures est très variable suivant la température ; les quantités les plus fortes peuvent être obtenues aussi bien à 25°C qu'à 15°C ou qu'à 35°C.

Reprenant cette étude, nous avons fait fermenter toujours dans les deux mêmes conditions d'aération, un moût de raisin de 13° Baumé par le *Saccharomyces ellipsoïdeus*. Nous avons déterminé les produits secondaires formés à cinq températures différentes, de 15°C à 35°C.

Le tableau X rapporte les résultats de la fermentation conduite à l'abri de l'air. On voit que c'est à 15°C que la fermentation a transformé le plus de sucre.

Le glycérol augmente, en règle générale, quand la température croît. La proportion de sucre subissant la fermentation glycéropyruvique est maximum à 35°C ; elle est minimum à 15°C. D'après BROCKMANN et STIER (14), à des températures avoisinant 40°C, la levure formerait moins de glycérol, mais la quantité de sucre fermenté est alors très faible.

L'acide succinique diminue légèrement quand la température augmente, tandis que les variations de l'acide acétique ne sont pas régulières. Finalement le rapport *a/s* augmente légèrement de 15°C à 35°C, la levure gardant toujours son caractère acétogène. L. GENEVOIS a remarqué sur des levures autrichiennes (34) que le froid ne modifie pas les produits formés par les levures acétogènes ; au contraire les levures succinogènes accumulent à faible température l'acide acétique et deviennent acétogènes.

La production d'acétoïne augmente avec la température ; il en est de même pour le 2,3 butanediol.

Nous trouvons des valeurs de Σ voisines de celles de g. Le rapport Σ/g diminue avec l'élévation de la température et il semble qu'à des températures plus basses, peut-être simplement parce que la durée de la fermentation est prolongée, interviennent plus facilement des enzymes respiratoires.

L'influence de la température sur la formation des produits secondaires est donc loin d'être négligeable. Certaines des réactions d'utilisation de l'éthanal sont très sensibles à l'action de la température.

TABLEAU X

Influence de la température sur la formation des produits secondaires
Moût de 13°B fermenté en anaérobiose par *Saccharomyces ellipsoïdeus* n° 41.

Teneurs en mmol par litre. Le sucre est exprimé en g.

Température	Sucre restant	Alcool formé	Glycérol g	Acide acétique a	Acide succinique s	Acétoïne m	2,3 — butanediol b	Éthanal h	Σ	100 Σ/g	100 a/s	1000 $(b+m)/g$
15°	1	12°6	*62*	11,8	6,5	1,1	5,3	0,6	*64*	104	182	103
20°	30	11°5	*69*	15,3	6,1	1,1	5,7	0,7	*70*	101	250	98
25°	23	11°9	*68*	15,5	5,4	1,5	6,4	1,1	*68*	101	287	116
30°	46	10°5	*73*	14,1	5,2	1,3	6,4	1,2	*64*	88	276	105
35°	82	7°8	*78*	14,3	5,3	2,2	7,4	1,2	*68*	87	276	123

Il faut remarquer aussi qu'une élévation de température augmente le taux de la fermentation glycéropyruvique ; on peut penser qu'elle favorise l'oxydoréduction portant sur la phosphoglycéraldéhyde ou retarde la réduction de l'éthanal.

IV. — INFLUENCE DE LA NATURE DU MILIEU

Le taux des produits secondaires formés par une même levure varie beaucoup suivant la nature du milieu fermenté. PASTEUR (96) avait déjà remarqué que les quantités de glycérol et d'acide succinique n'étaient pas les mêmes dans les vins et dans les fermentations en milieu sucré synthétique. LABORDE étudiant l'influence du milieu sur la production de glycérol constate que celle-ci est d'autant plus importante que la fermentation est plus pénible. VENTRE (141) signale que la teneur en glycérol et en acides volatils dépend du milieu fermentescible.

Nous avons étudié la formation des produits secondaires dans différents milieux naturels : moûts de raisin, moûts de bière, jus de cerises,

de pêches, de tomates et d'oranges. On opérait parallèlement avec un milieu synthétique préparé de la façon suivante. On calcine au four à moufle de la levure de boulangerie préalablement desséchée ; les cendres obtenues sont dissoutes dans de l'eau bidistillée (nous utilisons 500 g de levure fraîche pour 3 litres de milieu). Le milieu minéral obtenu est additionné de sucre, de 100 mg d'azote sous forme de sulfate d'ammonium, de 100 mg d'azote sous forme d'asparagine et des sept facteurs de croissance aux doses suivantes par litre : thiamine (0,2 mg), pantothénate de calcium (0,2 mg), acide paraaminobenzoïque (0,2 mg), acide nicotinique (0,2 mg), pyridoxine (0,2 mg), mésoinositol (10 mg), biotine (0,020 mg).

L'expérience a été faite avec une levure *Saccharomyces ellipsoïdeus* dans les deux conditions d'aération habituelles, et à la température de 25°C. Avant l'ensemencement tous les milieux étaient ajustés à pH 3,5 et à 200 g de sucre par litre.

Les résultats obtenus exposés dans le tableau XI pour la série fermentant en anaérobiose montrent que la nature du milieu fermenté influe non seulement sur le taux des produits secondaires, mais aussi sur la production d'alcool.

La fermentation va moins loin dans certains milieux comme le moût de bière ou la solution synthétique que dans les jus de fruits.

Tous les produits secondaires varient d'un milieu à l'autre. Le glycérol, le 2,3-butanediol, l'acide succinique varient sensiblement de 1 à 2,5, l'acétoïne de 1 à 5, l'acide acétique de 1 à 1,5. Cependant certains rapports demeurent constants : il est assez remarquable que mis à part le moût de bière et le milieu synthétique, les rapports 100 a/s obtenus dans les divers jus de fruits fermentés présentent des valeurs assez semblables. Il en est de même du rapport des produits butanedioliques au glycérol pour un certain nombre de milieux de culture.

On constate que la formation de glycérol est minimum pour le moût de bière, maximum pour le jus de cerises bigarreau. Les produits butanedioliques sont très faibles pour le jus de pêche et pour le moût de bière, très élevés au contraire dans le jus de cerises et le milieu synthétique. Enfin c'est dans les jus de cerises fermentés qu'on rencontre le plus d'acide succinique, tandis que les jus de pêches donnent le moins d'acide acétique.

Le bilan des produits secondaires n'est correct dans les deux conditions d'aération que dans le cas des moûts de raisins et des jus de tomates et d'oranges. Dans le cas des jus de cerises et de pêches, ce bilan est exact à l'abri de l'air mais non en milieu aéré. Ce fait et la grande quantité d'éthanal formée permettent de penser que l'excès de Σ sur g en milieu aéré est dû à une formation d'éthanal par oxydation et peut-être aussi d'acétoïne et d'acide succinique dans les jus de cerises.

Dans le cas du moût de bière Σ dépasse largement g même en anaé-

Tableau XI

Influence de la nature du milieu sur la formation des produits secondaires

Milieux amenés à 200 g de sucre par l et ajustés à pH 3,5.

Saccharomyces ellipsoïdeus nº 41.

Teneurs en mmol par litre. Le sucre est exprimé en *g*. Fermentations conduites en anaérobiose.

Milieu	Sucre restant	Alcool	Glycérol *g*	Acide acétique *a*	Acide succinique *s*	Acétoïne *m*	2,3-butanediol *b*	Éthanal *h*	Σ	100 Σ/*g*	100 *a*/*s*	1 000 (*b* + *m*)/*g*
Moût de raisin ..	13,1	11°3	*67*	10,4	6,4	0,5	6,9	0,8	*61*	92	168	110
Moût de bière ...	74,2	6°3	*37*	13,7	3,6	0,8	3,1	0,9	*51*	138	380	105
Jus de cerises bigarreau	4,3	10°1	*82*	12,8	8,0	0,4	7,8	0,4	*75*	91	160	100
Jus de cerises guin	3,6	9°6	*63*	10,7	8,8	0,4	7,5	1,6	*75*	119	122	125
Jus de pêches blanches.	2,0	10°1	*53*	9,4	6,2	0,3	3,5	1,5	*55*	104	151	72
Jus de pêches jaunes	2,3	9°2	*51*	8,0	5,6	0,2	3,1	2,4	*50*	98	142	65
Jus de tomates ..	2,4	10°2	*73*	10,6	7,7	0,2	5,9	2,1	*68*	93	138	84
Jus d'oranges....	2,6	11°4	*62*	9,6	6,5	0,2	6,0	2,0	*60*	97	147	100
Milieu synthétique	39,5	9°8	*56*	11,6	5,6	1,1	8,0	1,3	*63*	113	207	162

robiose ; il y a certainement dans ce cas intervention de diastases contenues dans le milieu ou d'activeurs qui favoriseraient des réactions supplémentaires. Il en est de même à un moindre degré dans un jus de cerises et dans le milieu synthétique. Il faut remarquer en tous cas le taux très faible du glycérol dans le moût de bière, aussi bien en anaérobiose qu'en présence d'air. Il n'en est pas moins intéressant de souligner qu'alors que g varie de 1 à 2,5, le rapport Σ / g reste toujours de l'ordre de 1.

La nature du milieu a donc une influence profonde sur les quantités relatives des produits secondaires que l'on trouve à la fin de la fermentation. Par les coenzymes, les facteurs de croissance et les activeurs spéciaux qu'apportent les divers milieux naturels, ils peuvent provoquer pour une levure donnée des modifications importantes dans le taux des produits de la fermentation et transformer les bilans.

V. — INFLUENCE DES FACTEURS DE CROISSANCE

Nous avons étudié de façon plus précise l'influence de la composition du milieu en facteurs de croissance sur la formation des produits secondaires. La plupart de ces facteurs agissent en effet comme coferments des diastases impliquées dans les processus de la fermentation. C'est le cas par exemple de la thiamine qui est le coenzyme de la carboxylase, de l'acide nicotinique qui entre dans la composition de la codéhydrase, etc. D'autre part on sait que pour certaines levures, en l'absence de certaines vitamines, la multiplication et la fermentation ne sont plus possibles ; pour d'autres cette absence se traduit par une modification de l'allure de la fermentation et de la croissance. Ces phénomènes ont été étudiés récemment par S. LAFOURCADE et E. PEYNAUD pour les levures de vin (68). Ainsi dans le cas de *Saccharomyces ellipsoïdeus* n° 41 que nous utilisons dans notre travail, ces auteurs ont trouvé notamment que l'absence de biotine restreignait beaucoup la croissance et que l'absence d'acide pantothénique se traduisait par un retard de la fermentation, la phase initiale de latence étant beaucoup plus longue ; dans ces dernières conditions, la levure arrivait à fermenter la même quantité de sucre, mais dans un intervalle de temps beaucoup plus grand.

Nous avons étudié les produits de la fermentation par le même *Saccharomyces ellipsoïdeus*, d'un milieu synthétique contenant par litre :

Cendres de 170 g environ de levure fraîche.
Saccharose : 182 g.
Sulfate d'ammonium : 1 g.
Asparagine : 2 g.
Phosphate monopotassique : 1 g.
Acide citrique : 6 g.
Soude, quantité suffisante pour amener le pH à 3,45.

Les vitamines étaient employées aux doses suivantes :

Thiamine : 0,2 mg.
Pantothénate de calcium : 0,2 mg.
Acide nicotinique : 0,2 mg.
Pyridoxine : 0,2 mg.
Acide paraaminobenzoïque : 0,2 mg.
Mésoinositol : 10 mg.
Biotine : 20 γ.

Nous avons expérimenté à 25°C, dans les deux conditions d'aération habituelles et avec un ensemencement faible. L'expérience comportait dans chaque cas 9 flacons : l'un fermentant sans aucune vitamine, un autre avec toutes les vitamines ; les 7 autres contenaient tous les facteurs de croissance sauf un, différent dans chaque cas. Nous avons pu étudier ainsi l'effet de l'absence de chacun de ces facteurs sur la formation des produits secondaires. Les résultats sont rassemblés dans le tableau XII.

La fermentation est retardée dans les flacons sans vitamine et sans pantothénate. L'absence de ce dernier influence nettement le taux des produits secondaires ; les quantités de glycérol, d'acide acétique et de 2,3-butanediol sont augmentées, aussi bien à l'abri de l'air qu'à l'air. La proportion de la fermentation glycéropyruvique représentée par le rapport $\frac{\text{glycérol}}{\text{sucre fermenté}}$, est beaucoup plus élevée (20 à 25 p. 100) quand l'acide pantothénique manque dans la solution nutritive. L'augmentation de la concentration de l'acide acétique en l'absence d'acide pantothénique se retrouve dans les deux séries, mais elle est surtout nette dans la fermentation à l'abri de l'air. LIPMANN et collaborateurs ont montré que l'acide pantothénique entre dans la constitution d'un coenzyme, essentiel pour les acétylations biologiques, qu'ils ont appelé coenzyme A. NOVELLI et LIPMANN (92) ont montré que l'acétate est oxydé par la levure beaucoup plus rapidement en présence d'acide pantothénique. Il résulte de leurs travaux que cet acide est essentiel pour toute une série de réactions (et peut-être toutes les réactions) impliquant le groupement acétyle (SEBRELL et HARRIS (128)). Notre expérience montre l'accumulation d'acide acétique et également celle, assez importante, du glycérol en l'absence d'acide pantothénique au cours de la fermentation surtout en anaérobiose. C'est un fait nouveau et on peut penser que la carence en ce facteur, provoquant un retard de la fermentation de GAY-LUSSAC, la période d'induction est plus longue et les mécanismes secondaires sont favorisés.

L'absence de mésoinositol ou de biotine diminue au contraire la formation de glycérol et d'acide succinique, mais n'a pas d'action nette sur les autres produits secondaires. Remarquons que là encore, il n'y a pas parallélisme entre la variation de l'acide succinique et celle des autres sous-produits.

Les autres facteurs de croissance ne semblent pas avoir un effet très

Tableau XII

Influence des facteurs de croissance sur la formation des produits secondaires

Saccharomyces ellipsoïdeus n° 41

A part le sucre et l'alcool, les concentrations sont exprimées en mmol par litre.

	Sucre	Alcool	Glycérol *g*	Acide acétique *a*	Acide succinique *s*	Acétoïne *m*	2,3-butanediol *b*	Éthanal *h*	Σ	100 Σ/*g*	100 *a*/*s*	1 000 (*b* + *m*)/*g*
Aérobiose												
Sans vitamine	16,7	9°0	*59*	17,5	3,6	0,4	6,4	1,1	*61*	105	485	115
Avec 7 vitamines	3,4	9°6	*79*	17,5	4,0	0,3	5,4	3,1	*64*	81	438	72
Sans pyridoxine	traces	9°8	*79*	11,5	4,6	0,2	4,3	1,7	*52*	66	250	57
Sans biotine	0,6	9°8	*65*	13,1	3,9	0,2	6,2	1,1	*53*	82	336	98
Sans mésoinositol	traces	9°7	*66*	7,5	3,7	0,1	3,4	3,7	*41*	62	202	53
Sans acide nicotinique	traces	10°0	*86*	10,6	5,1	0,1	4,3	1,4	*53*	62	210	52
Sans pantothénate de Ca	traces	9°8	*88*	20,9	4,3	0,1	7,2	1,1	*72*	81	485	83
Sans acide paraaminobenzoïque	traces	9°7	*78*	13,2	4,9	0,1	5,1	1,8	*58*	74	270	67
Sans thiamine	0,4	9°8	*83*	12,5	4,8	0,1	3,3	1,0	*54*	65	260	41
Anaérobiose												
Sans vitamine	23,2	9°0	*67*	22,5	4,2	0,4	7,3	2,7	*77*	115	535	115
Avec 7 vitamines	1,2	10°0	*80*	8,1	6,3	2,9	7,3	2,1	*63*	79	128	127
Sans pyridoxine	0,3	10°3	*59*	8,1	4,5	0,2	6,5	0,9	*47*	80	180	114
Sans biotine	0,3	10°2	*61*	9,0	4,2	0,6	7,6	1,1	*49*	80	215	134
Sans mésoinositol	0,2	10°3	*69*	8,7	4,1	1,0	7,7	1,8	*49*	72	212	126
Sans acide nicotinique	0,2	10°0	*74*	6,9	5,7	2,0	8,4	2,8	*57*	77	121	140
Sans pantothénate de Ca	0,1	9°8	*101*	23,1	5,7	0,6	11,0	5,4	*92*	91	412	114
Sans acide paraaminobenzoïque	0,2	10°2	*72*	7,6	5,7	1,5	6,8	1,7	*55*	76	133	115
Sans thiamine	traces	10°2	*71*	6,5	6,3	0,2	2,9	2,8	*51*	72	103	48

net sur les taux des produits secondaires, sauf la thiamine dont l'absence se traduit par une diminution marquée des corps acétoïniques. Or, l'ester pyrophosphorique de la thiamine constitue la cocarboxylase. Cette observation semble donc appuyer l'hypothèse qui attribue à un complexe carboxylasique la responsabilité de la condensation acétoïnique, à l'exclusion d'une « carboligase » distincte comme l'entendait NEUBERG ; nous aurons l'occasion d'y revenir dans le chapitre VII.

La carboxylase étant également nécessaire à la décarboxylation de l'acide pyruvique en éthanal, il est possible qu'en l'absence de thiamine une certaine quantité d'acide pyruvique n'ait pas été décarboxylée et se soit accumulée dans le milieu ; ceci expliquerait la faiblesse de Σ par rapport à g. Nous avons recherché cet acide par la 2,4 dinitrophénylhydrazine dans les témoins et dans les fermentations carencées en thiamine ; le résultat a été négatif dans le premier cas, mais dans les milieux fermentés sans thiamine, nous avons précipité, caractérisé et pesé la 2,4 dinitrophénylhydrazone de l'acide pyruvique et nous avons ainsi constaté la présence de 2 mmol par litre d'acide pyruvique en aérobiose et de 3,6 mmol par litre de cet acide en anaérobiose.

Plusieurs facteurs de croissance agissent donc sur les mécanismes mêmes de la formation des produits secondaires, sans doute parce qu'ils entrent dans la composition des enzymes responsables de ces réactions.

On remarque de plus qu'en l'absence de mésoinositol, d'acide nicotinique ou de thiamine, les produits dosés ne correspondent pas au glycérol ; ils sont à un taux inférieur (Σ/g faible), et on peut envisager la production d'autres substances, peut-être simplement l'accumulation d'acide pyruvique.

VI. — INFLUENCE DE LA TENEUR EN SUCRE

On conçoit qu'il y ait une relation entre la quantité de sucre fermenté et les proportions des produits secondaires formés. LABORDE, dès 1899, a signalé que le rendement en glycérol augmentait avec la richesse en sucre du milieu à fermenter, et d'autres auteurs ont fait des observations semblables en particulier en ce qui concerne l'acidité volatile.

Nous avons étudié les variations des différents produits secondaires avec la concentration en sucre dans le cas de fermentations par un *Saccharomyces ellipsoïdeus*. Notre expérience portait sur deux milieux : un moût de raisin ayant naturellement 200 g de sucre par litre, additionné de saccharose de façon à réaliser des teneurs de 300 et 400 g, un milieu synthéti que préparé de la même façon que dans le paragraphe précédent, et recevant différentes quantités de saccharose : 56, 110, 220, 350 et 450 g par litre.

Le dosage des produits secondaires en fin de fermentation a permis de dresser les tableaux XIII et XIV.

Tableau XIII

Influence de la teneur en sucre sur la formation des produits secondaires

Moût de raisin fermenté par *Saccharomyces ellipsoïdeus* n° 41

Les sucres sont exprimés en g par litre ; les produits secondaires en mmol par litre.

Teneur en sucre	Sucre fermenté	Glycérol *g*	Acide acétique *a*	Acide succinique *s*	2,3 — butanediol *b*	Éthanal *h*	Σ	100 Σ/*g*	100 *a*/*s*	1000 *b*/*g*
					Aérobiose					
200	199	*84*	10,6	10,5	5,2	2,1	*81*	96	101	62
300	250	*92*	20,6	11,0	10,7	1,1	*108*	117	188	116
400	210	*124*	36,7	8,2	7,8	1,5	*126*	102	423	63
					Anaérobiose					
200	186	*67*	14,2	8,0	6,4	0,9	*75*	112	177	96
300	181	*90*	23,0	7,1	10,5	0,8	*93*	103	325	117
400	146	*120*	33,0	7,3	6,8	1,5	*111*	92	450	57

Tableau XIV

Influence de la teneur en sucre sur la formation des produits secondaires

Milieu synthétique fermenté par *Saccharomyces ellipsoïdeus* nº 41

Les sucres sont exprimés en g par litre ; les produits secondaires en mmol par litre.

Teneur en sucre	Sucre fermenté	Glycérol *g*	Acide acétique *a*	Acide succinique *s*	2,3 — butanediol *b*	Éthanal *h*	Σ	100 Σ/*g*	100 *a*/*s*	1000 *b*/*g*
				Aérobiose						
56	56	*43*	3,6	4,6	0,8	0,2	*31*	73	78	19
110	110	*69*	9,3	5,0	2,5	1,3	*47*	68	186	36
220	220	*88*	12,4	5,0	9,8	1,1	*61*	68	248	111
350	288	*103*	24,8	5,0	20,3	1,5	*96*	93	496	196
450	194	*145*	36,2	5,5	23,6	5,1	*129*	88	658	167
				Anaérobiose						
56	56	*41*	4,2	4,6	0,9	0,3	*33*	78	91	22
110	110	*65*	8,1	4,8	2,7	1,0	*44*	67	168	41
220	193	*66*	12,4	5,7	9,8	1,4	*64*	98	218	148
350	170	*90*	20,6	4,6	13,8	2,8	*81*	89	450	153
450	170	*120*	33,6	5,5	17,8	4,2	*117*	97	610	148

On constate que le rendement absolu en glycérol augmente avec la teneur en sucre, comme l'avait remarqué LABORDE. Mais si l'on calcule a proportion de la fermentation glycéropyruvique, on observe qu'elle est généralement la plus faible pour une teneur en sucre de 200 g par litre. Elle s'élève lorsque cette teneur s'accroît ; elle est plus forte aussi dans le cas de milieux peu sucrés ; ceci est logique, puisque la plus grande partie du glycérol se forme aux dépens des premiers 50 g de sucre pendant la phase d'induction de la fermentation.

Le taux d'acide acétique augmente beaucoup avec la teneur en sucre, ainsi que le 2,3-butanediol dans la majorité des cas. Or la quantité de sucre fermenté dans tous ces milieux est souvent du même ordre de grandeur. L'augmentation des produits secondaires n'est donc pas due simplement au fait qu'il y avait davantage de sucre à fermenter, davantage de « matière première » à transformer. On doit penser qu'une forte concentration initiale en sucre favorise la fermentation glycéroacétique et les autres mécanismes de formation des produits secondaires. Seul le taux d'acide succinique ne présente aucune variation nette; il est presque aussi important lorsqu'il n'y a que 56 g de sucre à fermenter que lorsqu'il y en a 450 g dans le milieu. En conséquence, le rapport a/s ne cesse d'augmenter avec la richesse initiale en sucre.

On remarque aussi que non seulement le 2,3-butanediol augmente lorsque la teneur en sucre croît, mais que généralement le rapport 1000 b/g augmente de même. L'accroissement de la condensation acétoïnique est donc plus rapide que l'augmentation du taux de fermentation glycéropyruvique.

Autre remarque, le taux d'éthanal restant est beaucoup plus élevé pour les fortes teneurs en sucre (voir aussi chapitre IV).

La relation du bilan de fermentation se vérifie dans presque tous les cas, même pour les très fortes teneurs en glycérol. Comme nous l'avons souligné au sujet des fermentations alcalines, c'est là un argument non négligeable en faveur de l'hypothèse de l'équivalence du glycérol et des autres produits secondaires affectés des coefficients proposés par L. GENEVOIS.

VII. — ACTION D'UN ACTIVEUR DE FERMENTATION D'ORIGINE FONGIQUE

NIELSEN et HARTELIUS ont montré, en 1937 (91), qu'*Aspergillus niger* synthétise des substances capables d'accélérer la multiplication de *Saccharomyces cerevisiae*. Lorsqu'on ajoute à un milieu à fermenter du mycélium d'*Aspergillus niger* lavé à l'alcool, desséché et finement broyé, cette poudre active fortement la fermentation alcoolique. J. RIBÉREAU-

Gayon, E. Peynaud et S. Lafourcade ont montré que la plupart des moisissures et en particulier le *Botrytis cinerea* possèdent le même activeur (123). Une application pratique de ces produits au cours de la vinification a été envisagée. Ces auteurs ont observé qu'en présence d'un demi-gramme par litre de cette poudre de mycélium, la quantité de sucre fermenté en quatre jours est augmentée de 50 p. 100 et la population des levures est doublée. Kiessling (56) a montré que ce produit, qui contient en outre des facteurs de croissance pour les levures du groupe du bios, agit en doublant le taux des triosephosphates dosables en cours de fermentation. On doit donc s'attendre à une formation plus grande de glycérol et des autres produits secondaires.

Nous avons voulu voir dans quelle mesure l'introduction de cet activeur dans un milieu qui fermente, modifie la formation des produits secondaires (122).

Nous avons fait porter notre expérience sur deux milieux, un moût de raisin à 180 g de sucre par litre de pH 3,2 et un milieu à l'eau de levure à 200 g de saccharose par litre et de pH 5,6, fermentés par une levure *Saccharomyces ellipsoïdeus*. Un flacon de chaque milieu recevait au départ 1 g par litre de poudre d'*Aspergillus*. Les fermentations avaient lieu à 25°C à l'abri de l'air.

Tableau XV

Action des activeurs d'origine fongique sur la formation des produits secondaires. Saccharomyces ellipsoïdeus n° 51

Teneurs en sucre en g par litre ; les autres chiffres sont des mmol par litre.

	Sucre restant	Alcool	Glycérol *g*	Acide acétique *a*	Acide succinique *s*	2,3-butanediol *b*	Éthanal *h*	Σ	100 Σ/*g*	100 *a*/*s*	1000 *b*/*g*
Moût de raisin 10° B											
Témoin	12,2	9°8	*52*	10,1	5,2	3,7	1,0	*51*	98	194	70
Activeur d'*Aspergillus*	4,0	10°2	*73*	6,9	6,6	3,2	0,7	*51*	70	104	44
Milieu à l'eau de levure											
Témoin	5,5	11°9	*61*	10,0	6,1	4,4	0,7	*56*	92	164	72
Activeur d'*Aspergillus*	1,0	12°0	*76*	6,6	7,0	3,9	0,6	*53*	69	94	51
Moût de raisin 12°5 B											
Témoin	26	12°7	*82*	19,2	5,1	8,5	1,4	*74*	90	377	104
Activeur de *Botrytis*	3,2	13°0	*90*	10,3	7,6	9,7	0,8	*69*	77	136	108

Nous avons fait la même expérience en comparant à un témoin la fermentation d'un moût de 12°5 Baumé, additionné de mycélium de *Botrytis cinerea*. Ce mycélium avait été lavé à l'alcool, desséché et réduit en poudre. Il a la propriété d'activer la fermentation et d'augmenter la population des levures.

Le tableau XV rassemble les résultats obtenus dans ces deux expériences.

Les deux produits ont manifesté les mêmes propriétés ; ils ont permis à la fermentation qui se déroule à l'abri de l'air de transformer davantage de sucre. D'autre part, on peut calculer que la proportion de sucre subissant la fermentation glycéropyruvique est augmentée de 5,5 à 7 p. 100 ; le rendement en alcool est en conséquence légèrement abaissé de quelques dixièmes de degré.

Les autres produits secondaires subissent aussi des variations. L'acide acétique est fortement diminué, tandis que l'acide succinique augmente.

Fait important : le bilan de fermentation est déficitaire en présence d'activeur. Tout se passe comme si l'activeur favorisait, à partir de l'acide pyruvique de la fermentation glycéropyruvique, la formation de produits indosés. Les bilans acidimétriques ont montré que ces produits n'étaient vraisemblablement pas des acides.

VIII. — CONCLUSIONS

Tous les facteurs essayés dans ce chapitre influent finalement plus ou moins sur la proportion des différents produits secondaires. De petites différences d'aération, de température, d'acidité réelle, de richesse en sucre, interviennent dans les processus de la fermentation et modifient les quantités de glycérol, d'acide acétique, d'acide succinique, de 2,3-butanediol qu'on trouve dans les milieux fermentés. Signalons que nous avons étudié l'influence des conditions d'aération, de température et de concentration en ions hydrogène également sur la fermentation par une *Kloeckera apiculata* ; les résultats obtenus sont en gros de même sens qu'avec le *Saccharomyces ellipsoïdeus* mais en milieu aéré la fermentation est accompagnée de phénomènes oxydatifs.

La nature même du milieu dans lequel se développent les levures et, vraisemblablement, son taux en facteurs de croissance et en facteurs d'activation, dont certains nous sont du reste inconnus, sont capables de modifier profondément l'importance de la fermentation glycéropyruvique et le mode de distribution des divers produits secondaires à partir de l'éthanal. Les facteurs de croissance qui agissent comme coferments dans les processus fermentatifs, jouent ici un rôle déterminant et modifient dans un sens ou dans un autre la genèse de ces produits. Nous tou-

chons là au mécanisme de la formation de ces corps secondaires. L'expérience montre que pratiquement toutes les vitamines agissant par ailleurs sur la croissance des levures, sont impliquées dans ces réactions. Certaines favorisent le mécanisme glycéropyruvique, ce sont la biotine, la pyridoxine et le mésoinositol, d'autres au contraire, intervenant vraisemblablement dans le processus de la fermentation de GAY-LUSSAC, diminuent la durée de la phase d'induction, c'est notamment l'acide pantothénique.

D'autre part, le rôle joué par l'acide pantothénique dans la formation de l'acide acétique, et celui de la vitamine B_1 qui influe sur la condensation butanediolique, sont des faits susceptibles d'aider à l'interprétation du mécanisme de ces réactions.

SUR LE DOSAGE DU MÉTHANOL EN PRÉSENCE D'ÉTHANOL PAR ÉLECTROPHOTOMÉTRIE

PAR

Mme L. BOUZIGUES

Station centrale de Recherches sur l'Œnologie, la Cidrerie et les Jus de Fruits, Narbonne.

PLAN DU MÉMOIRE

I. — **Introduction.**

II. — **Considérations générales sur les méthodes utilisées.**

III. — **Travaux personnels** :

1° Choix d'une réaction colorée : fuchsine ; chlorydrate de phenyl hydrazine ; acide chromotropique.

2° Etude du rendement de l'oxydation permanganique du méthanol. Comparaison des méthodes BERTRAND et SILBERSTEIN, et TAVERNIER et JACQUIN.

3° Application du procédé aux vins.

IV. — **Conclusion.**

I. — INTRODUCTION

Le méthanol est un constituant normal des boissons alcooliques. On en retrouve des quantités importantes dans les vins de macération obtenus après fermentation au contact des matériaux solides de vendanges issues de cépages riches en pectine, tels que le grenache, le muscat ou le malvoisie. Des cépages pauvres en pectine tels que la clairette, donne des vins pauvres en ce composant. FLANZY (1), BERTRAND et les œnologues soviétiques (3) ont montré que les vins les plus riches en méthanol sont les vins de presse ; puis viennent les vins rouges de macération ; enfin les moins riches sont les vins blancs.

Le rôle du méthanol dans les substances génératrices du bouquet des vins est controversé ; pour les uns (BERTRAND et SILBERSTEIN) (2), il intervient d'une façon appréciable et positive, par contre, pour les autres (FROLOV BAGREEV-AGABALIANTZ (3) son action est négative. L'ensemble des chercheurs sont toutefois d'accord pour affirmer que son rôle physiologique est franchement mauvais par suite de sa faible oxyda-

bilité par les organismes vivants. Son ingestion même à faible dose le rend beaucoup plus dangereux que l'éthanol. Il est donc un élément très important de la toxicité des eaux de vie où il se trouve en doses bien supérieures à celles qu'on trouve dans le vin.

Pour toutes ces raisons, le dosage de ce corps s'avère très important : ce qui explique les nombreuses tentatives réalisées, au cours de ces dernières années, pour le doser avec une précision acceptable.

II. — CONSIDÉRATIONS GÉNÉRALES SUR LES MÉTHODES UTILISÉES

On distingue :

a) Des méthodes colorimétriques, les plus nombreuses, qui mettent en évidence la formaldéhyde, produit de l'oxydation ménagée du méthanol, par une réaction colorée ; ce sont les méthodes DENIGES, VON FELLENBERG, TRILLAT, qui ont été modifiées plus récemment par BERTRAND et SILBERSTEIN, TAVERNIER et JACQUIN et des auteurs étrangers : CERUTTI et VENADI, MARIANI, NOVELLI et BOOS.

b) Une méthode à la fois volumétrique et pondérale : la méthode FLANZY. Ce procédé très original est basé, d'une part sur l'ioduration monomoléculaire des alcools primaires du milieu, et d'autre part, sur l'oxydation à froid de ces alcools avec détermination des quantités d'oxygène consommées.

Chaque formule d'ioduration et d'oxydation permet l'établissement d'une relation algébrique entre les quantités d'alcool méthylique et d'alcool éthylique à déterminer et les indices d'ioduration et d'oxydation trouvées expérimentalement.

La résolution du système d'équation du premier degré à deux inconnues donne les masses respectives d'alcool méthylique et éthylique du distillat.

Cette méthode, bien que précise, présente l'inconvénient d'être longue et minutieuse et ne peut être utilisée comme méthode d'analyse courante.

c) Des méthodes volumétriques : les méthodes SAVENKOVA et PEAUD-LENOEL.

La méthode SAVENKOVA (4) est basée sur une oxydation manganique du méthanol en formol, oxydation de ce dernier corps par le chlorate de potasse et dosage correspondant des ions Cl formés par argentimétrie.

Le dosage du formol par argentimétrie s'exécute sans difficultés même en présence d'alcool éthylique et d'acétaldéhyde. Toutefois, le rendement de la réaction d'oxydation manganique du méthanol, dans les conditions données par l'auteur, ne permet pas d'évaluer d'une façon satisfaisante par argentimétrie les quantités trop faibles de formol produites, quantités qui sont dans les limites d'un microdosage.

La technique PEAUD LENOEL (5) fait appel à l'oxydation chromique quantitative à froid du méthanol en anhydride carbonique et eau. Le CO_2 formé, entraîné par un courant d'air décarbonaté, est dosé suivant le procédé NICLOUX par acidimétrie.

Cette méthode, très rationnelle dans son principe, présente l'inconvénient d'être longue et délicate.

Pour ces différentes raisons nous avons adopté les méthodes colorimétriques, qui, améliorées, sont rapides et d'une sensibilité et d'une précision satisfaisantes.

III. — TRAVAUX PERSONNELS

1° Choix d'une réaction colorée du formol

Les réactifs choisis pour la caractérisation de la formaldéhyde, issue de l'oxydation de nombreux composés organiques (acides aminés, polyols), par les différents auteurs qui se sont intéressés à la question ces dernières années, sont le plus souvent la fuschine bisulfitée, le chlorhydrate de phényl hydrazine et surtout l'acide chromotropique.

A) LA FUSCHINE BISULFITÉE ou réactif de SCHIFF a été en particulier utilisée, pour caractériser le formol obtenu par oxydation du méthanol, par BERTRAND et SILBERSTEIN et par TAVERNIER et JACQUIN.

Nous avons essayé ce réactif en partant d'une solution pure de formol dépolymérisé en solution aqueuse et en établissant une gamme étalon.

Les lectures ont été effectuées à l'électrophotomètre BONET et MAURY avec l'écran vert n° 13 (absorption maxima 520 m/μ). Nous avons construit la courbe en portant en ordonnées les teneurs en formol et en abcisses les densités optiques absolues. Les points obtenus ne sont pas sur une droite ; la réaction colorée ne suit pas la loi de LAMBERT BEER.

La spécifité de la réaction reste douteuse car le réactif de SCHIFF donne une intense coloration violet rouge avec des traces d'acétaldéhyde. Ce constituant se trouve toujours en présence de formol dans le cas qui nous intéresse.

Selon FLANZY (6), si l'action du réactif se produit en présence d'une quantité importante d'acide minéral, la coloration dûe au méthanal précède celle que produirait l'éthanal ; au contraire, si le milieu est faiblement acide, cette coloration précède la coloration dûe à H-COH, qui est beaucoup plus faible. En outre, les colorations dûes à H-COH sont plus violacées que les colorations dûes à CH_3-COH ; mais cette discrimination entre les deux aldéhydes est d'autant plus délicate que le rapport $\frac{\text{méthanal}}{\text{éthanal}}$ est plus faible.

D'après TAVERNIER et JACQUIN, l'intensité de la coloration croît après addition du réactif et atteint son maximum en 1 h 1/2 à 2 h, reste stable 1 heure, puis décroît rapidement.

B) LE CHLORYDRATE DE PHÉNYL HYDRAZINE, selon la réaction indiquée par SCHRYVER obtenue en acidifiant fortement un mélange de formaldéhyde de phényl hydrazine et de ferricyanure de K, semble posséder une grande spécificité. D'après cet auteur, la réaction n'est positive, en dehors du formol, qu'avec du furfurol.

FLANZY préconise cette réaction colorée comme étant sensible et se prêtant facilement à des essais comparatifs. De plus, ce procédé a été utilisé par DESNUELLE et NAUDET pour le microdosage colorimétrique du formol et son application au dosage du glycérol, de l'éthylène et du propylène-glycol, ces derniers corps étant oxydés par l'acide périodique. Nous avons, comme pour la fuschine bisulfitée, établi une gamme étalon à partir d'une solution mère de formol dosée par iodométrie, selon la technique DESNUELLE et NAUDET (7). Cette gamme varie de 5 à 40 γ de formol par ml.

Le tableau suivant rassemble les résultats obtenus.

Les lectures sont faites à l'électrophotomètre BONET et MAURY avec le filtre 3 (530 m/μ) et la cuve 0,5 cc.

Échantillons	Sol. de formol en γ	Lectures	D. o. absolues
T	0	10	
1	5	18,8	8,8
2	10	28	18
3	20	38	28
4	30	47,2	37,2
5	40	59,1	49,1

La courbe construite en portant en abcisses les d.o. absolues et en ordonnées les quantités de formol, est sensiblement une droite.

Le procédé appliqué selon la modification de DESNUELLE et NAUDET donne des résultats satisfaisants. Il est nécessaire, pour éviter la formation d'un trouble en ajoutant les réactifs, de refroidir fortement. La réaction colorée est très sensible, mais manque un peu de stabilité. En effet, l'examen colorimétrique doit se faire dans 15 minutes, au bout desquelles l'intensité de la coloration diminue rapidement.

En faveur de ce procédé, nous avons constaté que l'éthanol et l'éthanal n'interviennent pas dans la réaction.

C) L'ACIDE CHROMOTROPIQUE (acide 1-8 dihydroxynaphtalène, 3-6 disulfonique).

Cet acide a été utilisé pour caractériser la formaldéhyde par un grand nombre d'auteurs étrangers : BOYD et LOGAN, BRICKER et JOHNSON, BOOS, BRICKER et AUBREY ; NOVELLI et COPELLO.

Ces auteurs ont appliqué la réaction d'EEGRIWE (8) en apportant des modifications pour l'adapter à leur milieu. La plupart l'utilisent pour doser divers corps organiques donnant par oxydation du formol.

Boos, Novelli et Copello l'ont employée en vue du dosage du méthanol en présence d'alcool éthylique.

Melle Ournac, de la Station de Narbonne, a utilisé cette réaction pour doser le formol formé par oxydation périodique du glycérol.

L'acide chromotropique donne une coloration violette avec le formol, spécifique de ce corps, mais le mécanisme de cette réaction n'a pas été jusqu'ici élucidé ; seule l'acétaldéhyde donne une coloration jaune-brun. Toutefois la coloration dûe à l'acétaldéhyde dans les conditions de nos expériences ne gêne pas. On peut signaler que dans le cas où l'acétaldéhyde, ou d'autres corps pouvant interférer, gênent la réaction colorée, on peut appliquer le procédé original décrit par Bricker et Aubrey (9) basé sur le fait expérimental suivant : que seul le formol d'une solution aqueuse est retenu par l'acide chromotropique solide, quand on chauffe le mélange à une température inférieure à 200°, jusqu'à siccité. Après s'être ainsi débarrassé des constituants gênants, on traite le résidu par l'acide sulfurique concentré et la réaction d'Eegriwe s'effectue alors sans difficulté.

L'intensité de la coloration obtenue pour une même quantité de formol est fonction de la température et de la durée du chauffage du mélange en réaction, ainsi que de la concentration du réactif à l'acide chromotropique. Ces trois données varient selon les auteurs ; en particulier, la plupart utilisent l'acide chromotropique en solution aqueuse à différentes concentrations. Pour obtenir des résultats constants et comparables il est nécessaire de fixer exactement les conditions opératoires. La constance des résultats dépend de la pureté des réactifs.

L'acide chromotropique du commerce est le plus souvent impur ; il renferme parfois 40 p. 100 de ClNa : utilisé tel quel il conduit souvent à des résultats erronés. Bricker et Johnson proposent de le purifier de la façon suivante : on dissout 10 g de cet acide dans 100 ml d'eau, on filtre les matières insolubles, on concentre par évaporation le filtrat à 8 à 10 ml ; et on ajoute 250 ml d'éthanol ; une matière cristallisée presque blanche se sépare, que l'on peut filtrer et sécher (1).

Nous avons utilisé le procédé de préparation du réactif décrit par Novelli : L'acide chromotropique est dissous en refroidissant à 0° dans l'acide sulfurique à 75 p. 100 ; la solution à 0,05 % obtenue est pratiquement incolore, et se conserve plus longtemps que les solutions aqueuses de ce corps qui brunissent très rapidement, et qu'on doit préparer avant chaque essai. Nous avons, comme précédemment, établi une courbe étalon avec du formol pur dépolymérisé.

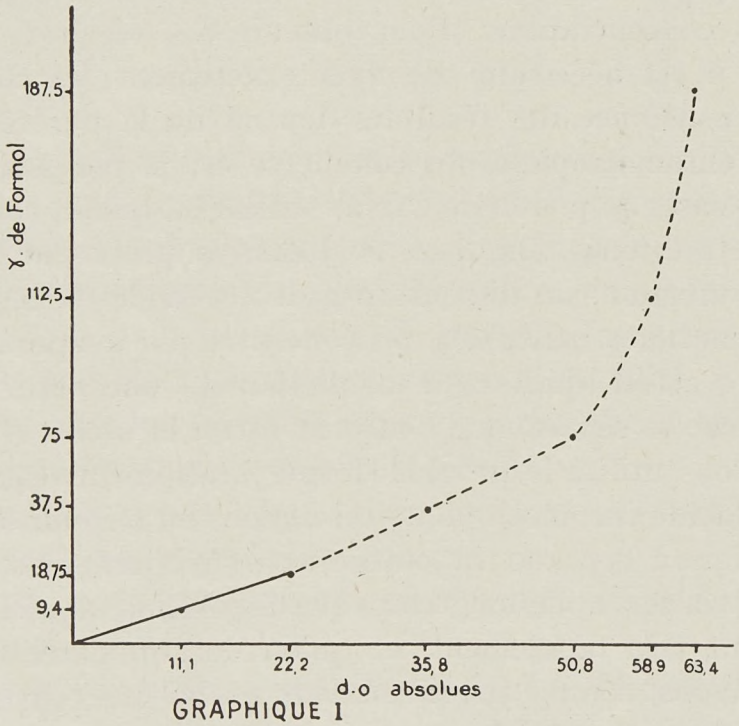
La technique opératoire a été la suivante : Dans un tube à essais

(1) Les auteurs notent que l'acide chromotropique provenant de la firme Eastman-Kodak Company quoique vendu à un degré de pureté pratique, contient peu ou pas de chlorure et peut être employé sans purification. Nos essais ont été faits avec le produit Eastman-Kodak Company.

bouché émeri, nous avons mis 1 ml de chacun des échantillons de la gamme étalon établie à partir de la solution mère de formol et nous avons ajouté 3,2 ml d'eau distillée (afin de nous trouver dans les mêmes conditions que lorsque nous ajoutons les oxydants nécessaires pour la transformation du méthanol en formol). Les tubes ont été ensuite placés dans un bain d'eau glacée ainsi que le réactif à l'acide chromotropique. Après quelques minutes, nous avons ajouté le réactif, avec précaution et très lentement, afin d'éviter l'élévation de la température qui provoquerait une perte de formol ; nous avons bouché et agité, les tubes ont été portés au bain-marie à 70°C (± 2) pendant 1 heure.

Après refroidissement nous avons examiné les colorations obtenues au photocolorimètre en utilisant le filtre vert-jaune 4, (560-600 m/μ). Le tableau suivant donne les résultats trouvés pour des quantités de formol variant de 10 à 200 γ par ml., dans deux séries d'essais.

Échantillons	Formol en γ	d. o. relatives	d. o. absolues	d. o. relatives	d. o. absolues
T	0	8,40		8,40	
1	9,40	19,50	11,10	19,30	10,90
2	18,75	30,60	22,20	30	21,60
3	37,50	44,20	35,80	44,70	36,30
4	75	59,20	50,80	60,40	52
5	112,50	67,30	58,90	67	59,60
6	187,50	71,80	63,40	70,90	62,50



GRAPHIQUE I

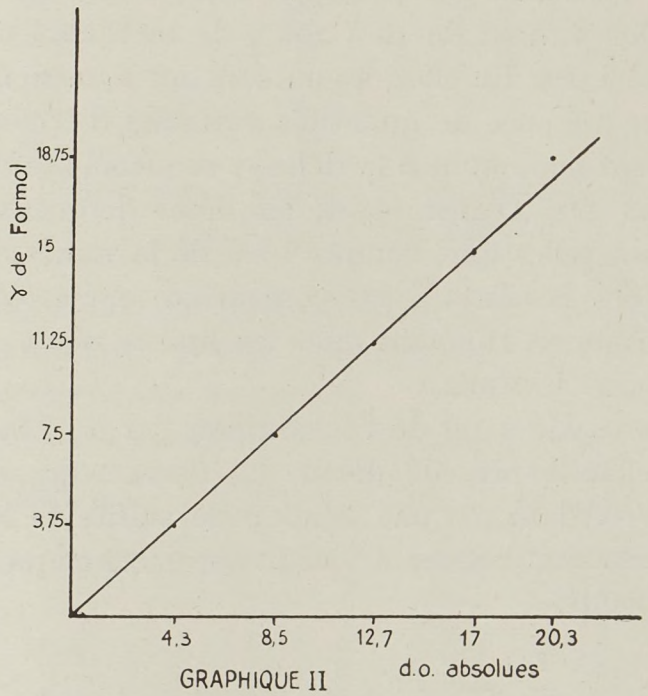
On peut constater que :

Les résultats sont constants et que seuls les deux premiers suivent la loi de LAMBERT-BEER. La courbe obtenue n'est pas une droite, mais a une allure assymptotique (graphique I).

Les deux premiers points étant alignés, nous avons donc essayé des dilutions de formol plus faibles ; les résultats que nous avons obtenus sont les suivants :

Échantillons	Formol en γ	Lectures	D. o. absolues
T	0	8,20	
I	3,75	12,50	4,30
II	7,50	16,70	8,50
III	11,25	20,90	12,70
IV	15	25,20	17
V	18,75	28,50	20,30

Portées dans un système de coordonnées rectangulaires les valeurs précédentes déterminent des points qui se répartissent sensiblement sur une droite (graphique II). Ces essais, refaits dans les mêmes conditions, nous ont donné les mêmes résultats ; de plus, examinés au photocolorimètre après un intervalle de plusieurs heures, nous avons retrouvé les mêmes densités optiques.



GRAPHIQUE II

Ce procédé nous a paru très intéressant, étant donné la spécificité du réactif à l'acide chromotropique, la stabilité de la réaction colorée obtenue et la constance des résultats. Nous l'avons adopté dans l'étude relative à l'oxydation du méthanol.

2° Étude de l'oxydation permanganique du méthanol

L'oxydation du méthanol en formol par le permanganate en milieu acide a été utilisé par de nombreux auteurs français et étrangers. Selon BERTRAND et SILBERSTEIN cette réaction est la suivante :

$$5\ CH_3—OH + 2\ MnO_4K + 3\ SO_4H_2 \rightarrow 5\ CH_2O + 2\ SO_4Mn + SO_4K_2 + 8H_2O$$

ou plus simplement, à pH = O et à température constante :

$$2CH_3OH + O - O \rightarrow 2CH_2O + 2H_2O$$

Cette réaction n'est jamais complète et varie selon les conditions opératoires.

M. M. JACQUIN et TAVERNIER (10) ont fait une étude détaillée de l'influence des divers facteurs physiques et chimiques sur le rendement de la réaction.

Nous avons comparé les procédés d'oxydation décrits par TAVERNIER et JACQUIN et ceux proposés par BERTRAND et SILBERSTEIN.

Il est possible de déterminer la constance des résultats et le rendement de l'oxydation de chacune de ces méthodes en utilisant la réaction colorée décrite précédemment.

A) TECHNIQUE TAVERNIER ET JACQUIN. — Nous avons utilisé une solution de méthanol pur et établi, comme dans le cas du formol, une gamme étalon variant de 10 à 200 γ de méthanol par ml dans de l'alcool éthylique à 2°5. En effet, les auteurs ont montré que l'oxydation du méthanol, en présence de quantités variables d'éthanol, s'effectuait avec un rendement maximum si la richesse en alcool éthylique du milieu ne dépassait pas 2°5. D'autre part, les doses de méthanol présentes dans les vins sont telles que, compte tenu de la richesse alcoolique du vin la dilution des distillats à 2°5 correspond, après oxydation, à des quantités de formol se trouvant dans les limites où la réaction d'EEGRIWE suit la loi de LAMBERT.

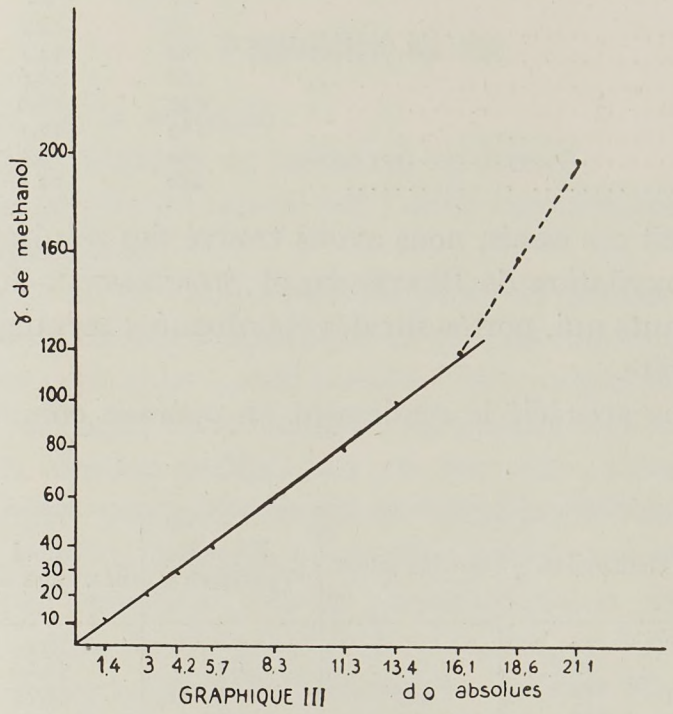
Nous avons oxydé 1 ml de l'échantillon par du MnO_4K en milieu phosphorique selon le procédé décrit par TAVERNIER et JACQUIN et détruit l'excès d'oxydant par une solution de sulfite de Na ; nous avons terminé par la réaction colorée à l'acide chromotropique. Les résultats ont été les suivants.

N° échantillons	T	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Méthanol par ml	0	10	20	30	40	60	80	100	120	160	200
Lectures	9,4	10,8	12,4	13,6	15,1	17,7	20,7	22,9	25,5	28	30,5
D. o. absolues		1,4	3	4,2	5,7	8,3	11,3	13,4	16,1	18,6	21,2

Ces résultats portés sur des coordonnées rectangulaires (graphique III) nous donnent une droite jusqu'au 8me échantillon. En effet, au N° 8, le rendement de l'oxydation n'étant pas total, la quantité de formol obtenue après oxydation doit être, d'après les densités optiques, de l'ordre de 18. Plusieurs essais refaits dans les mêmes conditions nous ont donné des résultats sensiblement identiques. Nous pouvons donc conclure que l'oxydation selon le mode opératoire de TAVERNIER et JACQUIN donne des résultats constants.

Pour obtenir le rendement de l'oxydation nous considèrerons les quantités de formol trouvées après oxydation et les quantités de formol

théoriques. Les quantités de formol trouvées seront obtenues en se rapportant à la courbe d'étalonnage du formol, à l'aide des densités optiques absolues trouvées nous avons les quantités correspondantes de formol. Quant aux quantités de formol théoriques, elles seront calculées sachant



GRAPHIQUE III

que 32 γ de méthanol → 30 γ formol, dans le cas de l'oxydation totale de ce corps. Le tableau suivant rassemble les résultats trouvés et calculés et donne les rendements obtenus.

N° échantillons	Méth. en γ	d. o. absolues	Formol trouvés en γ	Formol théoriques en γ	Rendement %
1.....	10	1,4	1,2	9,375	12,7
2.....	20	3	2,6	18,75	13,8
3.....	30	4,2	3,7	28,1	13,2
4.....	40	5,7	5	37,5	13,3
5.....	60	8,3	7,4	56,2	13,1
6.....	80	11,3	10	75	13,3
7.....	100	13,4	11,9	93,75	12,6
8.....	120	16,1	14,3	112,2	12,7
9.....	160	18,6	16,5	150	11
10.....	200	21,2	18,75	187,5	10

Le rendement est de 12,6 à 13,8 p. 100 jusqu'au 8me échantillon ; il baisse lorsque la teneur en méthanol augmente, mais reste dans des limites satisfaisantes.

B) Technique Bertrand et Silbertein. — MM. Bertrand et Silberstein (11) emploient des solutions étalon allant de 40 à 50 γ de formol au minimum par ml jusqu'à 200 et 300 γ au maximum.

Ces auteurs utilisent l'acide sulfurique au lieu de l'acide phosphorique. Pour pouvoir comparer les procédés d'oxydation, nous avons utilisé

des solutions de méthanol dans l'alcool à 2°5. Nous avons fait varier les teneurs en méthanol de 60 à 240 γ par ml.

Les résultats trouvés sont les suivants :

N° échantillons	Méthanol en γ	Lectures	D. o. absolues
T	0	12,1	—
1	60	14,1	2
2	100	15,6	3,5
3	120	16,6	4,5
4	160	18,1	6
5	200	19,5	7,4
6	240	22	9,9

En refaisant ces essais, nous avons trouvé des résultats identiques ; la méthode d'oxydation de BERTRAND et SILBERSTEIN donne donc des résultats constants qui, portés sur des coordonnées rectangulaires, déterminent une droite.

Nous avons apprécié le rendement en opérant comme dans le cas précédent.

N° échantillons	Méthanol en γ	d. o. absolues	Formol trouvés en γ	Formol théoriques en γ	Rendement %
1	60	2	1,7	56,25	3
2	100	3,5	3,1	93,75	3,3
3	120	4,5	3,9	112,5	3,4
4	160	6	5,3	150	3,5
5	200	7,4	6,5	187,5	3,4
6	240	9,9	8,8	225	3,9

Le rendement de l'oxydation par ce procédé est relativement constant il varie de 3 à 3,9 p. 100 ; on peut remarquer que la constance du rendement est analogue dans les deux méthodes. Celui obtenu par le procédé de TAVERNIER et JACQUIN est plus élevé, ce qui peut être dû à :

a) la supériorité de PO_4H_3 sur SO_4H_2 :

Comme l'ont constaté certains auteurs (FELLENBERG, KOLHTOF et MARIANI) PO_4H_3 a l'avantage de favoriser en milieu éthylique l'oxydation de l'alcool méthylique par rapport à l'alcool éthylique.

En effet, l'essai à blanc obtenu avec le procédé BERTRAND et SILBERSTEIN est plus coloré en jaune que celui obtenu avec le procédé TAVERNIER et JACQUIN. Ceci est dû à une plus forte proportion d'acétaldéhyde formée dans le milieu qui donne une coloration jaunâtre avec l'acide chromotropique.

b) la teneur en permanganate supérieure à celle du procédé BERTRAND (24 mg de MnO_4K contre 3 mg dans le procédé BERTRAND pour 1 ml de prise d'essai) : TAVERNIER et JACQUIN ont ajouté la quantité théorique de MnO_4K nécessaire pour oxyder la totalité de l'éthanol et du méthanol de la prise d'essai.

c) la durée d'oxydation supérieure dans le premier procédé que

nous avons essayé (20 minutes contre 5 minutes dans le procédé BERTRAND).

A cause de son rendement supérieur nous avons adopté la technique d'oxydation de TAVERNIER et JACQUIN.

3° Application au vin

a) Principe de la méthode :

1° oxydation ménagée du méthanol en formol ;

2° réaction colorée du formol par l'acide chromotropique.

b) Mode opératoire.

On distille 50 ml de vin, on recueille 40 ml de distillat que l'on dilue à 2°5, compte tenu du degré alcoolique du vin ; on introduit 1 ml de cette dilution dans un petit tube à essai bouché émeri, auquel on ajoute 0,6 ml de PO_4H_3,N/1 ; on agite et on porte au bain-marie à 35° ; on place aussi au bain marie la solution de MnO_4K à 3 p. 100 pour l'amener à la température de 35°. Après quelques minutes on introduit 0,8 ml de MnO_4K, on bouche, on agite et on laisse se poursuivre l'oxydation pendant 20 minutes ; on détruit ensuite l'excès de permanganate en ajoutant 0,5 ml de solution de sulfite de Na anhydre à 10 p. 100, on agite et on laisse 10 minutes en contact. On introduit ensuite 0,3 ml de SO_4H_2 à 20 p. 100 en volume. Le contenu du tube doit être incolore. On porte les tubes dans un bain d'eau glacée, dans lequel on a déjà mis la solution d'acide chromotropique. Après quelques minutes pour permettre que le contenu des tubes soit froid, on ajoute avec précaution, et goutte à goutte, le réactif, on bouche et agite dans l'eau glacée. On porte ensuite les tubes 1 heure au bain marie à 70° (±2) C. Après refroidissement, on effectue la lecture colorimétrique à l'électrophotomètre avec le filtre N° 4 (absorption 560-600 mμ) sous 10 ml d'épaisseur ; parallelement on fait un essai à blanc sur 1 ml de solution aqueuse d'alcool éthylique à 2°5.

A l'aide de la courbe étalon établie dans les mêmes conditions, on déduit la quantité de méthanol dans la prise d'essai, et on remonte à la teneur de l'échantillon primitif en tenant comte des dilutions.

Nous avons déterminé le méthanol de deux vins rouges ayant respectivement 11° et 10°5. Nous avons aussi dosé ce corps dans ces vins après les avoir enrichis de 60 mg de méthanol par litre.

Le tableau suivant donne les résultats obtenus :

Vins rouges	Méthanol ajouté en mg/l	Lectures	d. o. absolues	Méthanol trouvé en mg/l
T		9,2		
11	0	14,9	5,7	160
	+ 60	17,1	7,9	228
10,5	0	13,8	4,6	138
	+ 60	15,7	6,5	184

IV. — CONCLUSION

Les résultats obtenus démontrent que le procédé d'oxydation Tavernier et Jacquin permettant d'apprécier généralement 13 p. 100 de la quantité primitive d'alcool méthylique, justifie notre choix.

Ce procédé d'oxydation complété par la réaction spécifique d'Eegriwe, permet d'obtenir un dosage de méthanol rapide, d'une précision et d'une sensibilité satisfaisantes.

Reçu pour publication en Mai 1954.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

(1) Flanzy (M.). — L'alcool méthylique dans les liquides alcooliques naturels. *Thèse Imp. Régionale*, Toulouse, 1934.

(2) Bertrand (G.) et Silberstein (L.). — Sur la teneur des vins en méthanol. *C. R. Ac. Sc.*, 229, p. 1281, 1949.

(3) Frolov-Bagreev et Agabaliantz. — Chimie du vin, 1951, 293.
Cerutti (G.) et Venadi (A.). — Sulla determinazione des métanolo nei vini e nei fermenti alcolici. *Ann. Speriment. Agrar.*, V, n° 2, p. 419, 1951.
Mariani (A.). — La determinazione de piccolo quantita di alcole metilico nell étilico. *Rend. Ist. Sup. San.*, **13**, p. 11, 1950.
Novelli (A.). — Tecnica sencilla para la determinacion de alcohol metilico en alcohol etilico. *Anale de la Direccion Nacional de Quimica* (Argentine). N° 6, 3e année, 1950.

(4) Savenkova (Mme O.). — Travaux de l'Institut de Recherches Scientifiques sur la Viticulture et l'Œnologie. **7**, 67, 1939.

(5) Peaud-Lenoel (C.). — Microdosage de l'alcool méthylique dans les milieux alcooliques complexes. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, oct.-déc., p. 868, 1946.

(6) Flanzy (M.). — Sur les méthodes de recherches et de dosage de l'alcool méthylique dans les liquides et les milieux naturels. *Ann. Fals.*, p. 148, 1935.

(7) Desnuelle (P.) et Naudet (M.). — Microdosage colorimétrique du formol. *Bull. Soc. Chim.*, **12**, p. 872, 1945.

(8) Eegriwe (E.). — Reaktionen und Reagenzien zum Nachweis organischer Verbindungen. *Z. Anal. Chem.*, **110**, 22, 1937.
Boyd (Y.) et Logan. — Colorimétric détermination of serine. *J. Biol. Chem.*, 1946, 279, 1942.
Bricker (C. E.) et Johnson (H. R.). — Spectrophotométric Method for determining fomaldéhyd. *Ind. Eng. Chem. Anal.*, Ed. **17**, 400, 1945.
Boos (R. N.). — Quantitative colorimétrie Microdétermination of methanol with chromotropic acid. reagent. *Anal. Chem.*, **20**, 964, 1948.
Copello (M. A.). — Applicacion de la reaccion de Eegriwe a la investigacion y valoracion de alcohol metilico en alcoholes y bebidas. *Ann. de la Direccion, Nacion. de Quim.*, **3**, 81-84, 1940.
Ournac (Melle A.). — Nouvelle technique de dosage colorimétrique du glycérol. *Ann. Tech. Agr.*, Série E, 11, 137, 1953.

(9) Bricker (C.) et Aubrey Vail (W.). — Microdetermination of formaldehyde with. chromotropic acid. *Anal. Chem.*, **22**, 720, 1950.

(10) Jacquin (P.) et Tavernier (J.). — Microdosage colorimétrique du méthanol. Application de la méthode aux cidres et eaux de vie de cidre. *Ann. Tech. Agri.*, Série E, **11**, p. 113, 136, 1953.

(11) Bertrand (G.) et Silberstein (L.). — Méthode améliorée de recherche et de dosage de petites quantités de méthanol. *Ann. Inst. Past.*, T **74**, **1**, p. 234-241, 1948.

REMARQUES SUR LA CONCENTRATION DES VINS PAR LE FROID

PAR

M. FLANZY

Station centrale de recherches sur l'Oenologie, la Cidrerie et les Jus de fruits, Narbonne

---

De nombreuses études ont paru sur cette question. Le sujet n'étant pas épuisé, d'autres paraîtront encore. Ceci est tout à fait normal et dans la belle tradition de la recherche et du progrès.

Seulement certains esprits ont tendance à ne voir dans la concentration que le seul aspect de l'utilisation du froid en œnologie. Certains autres, opposés à ce traitement, auraient tendance à généraliser leurs critiques à l'ensemble des applications œnologiques du froid.

C'est pourquoi les critiques faites ou à la concentration, ou à l'emploi du froid lui-même, sont loin d'être toujours aussi objectives qu'elles devraient l'être.

Notre intention est de montrer les différents aspects de la concentration. des vins par le froid. Ceci fait, nous essayerons de discuter chacun de ces aspects. Les lecteurs des *Annales* seront ainsi mieux informés pour apprécier à leur exacte valeur les mémoires ou notes consacrés au problème de la concentration qui ont paru, qui paraissent ou qui paraîtront dans ces *Annales* ou dans d'autres publications.

Nous laisserons donc de côté toutes les autres applications œnologiques du froid, dont l'étude constitue une partie de notre Rapport général au VIIe Congrès International de la Vigne et du Vin à Rome (13-20 décembre 1953).

La concentration des vins par le froid obéit à deux impératifs : d'une part, atténuer les inconvénients d'une maturité insuffisante, et atteindre en particulier le degré minimum imposé. Le taux d'enrichissement est limité par la loi. L'augmentation ne peut dépasser 2°5 et le volume du vin ne doit pas être réduit de plus du quart. On admet que dans ces conditions le vin conserve ses caractères génériques. Cet enrichissement n'est autorisé que pour les vins de consommation courante.

D'autre part, produire des boissons à base de vin, à forte concentration alcoolique, réunissant en principe sous un volume réduit les caractères essentiels de la boisson initiale.

Les travaux de recherche les plus récents entrant dans la première catégorie sont, en France, ceux de DEPARDON et de Mlle MAUVISSEAU, de la Station de Blois, en 1951 (*C. R. Ac. Ag. de France, 38*, 360 ; 1952).

Ces auteurs trouvent le procédé avantageux par certains côtés : réduction du volume du vin, précipitation d'un excès de bitartrate de potassium, élimi-

nation, le cas échéant, de Fe et, par conséquent, diminution de possibilités de casses ferriques.

En contre-partie, ils notent les graves inconvénients d'une acidité titrimétrique sensiblement élevée et fort désagréable à la dégustation ; parfois un jaunissement des vins blancs, si la technique d'extraction des glaçons est basée sur la centrifugation et non sur la pression (cryoextraction). L'aération ainsi produite rend délicate l'application de la concentration aux vins sensibles à la casse oxydasique.

Enfin ces auteurs notent que lorsque le degré naturel est trop faible, les frais généraux de concentration peuvent ne pas rendre l'opération rentable.

Finalement les auteurs donnent la conclusion suivante : « La concentration n'étant suceptible d'aboutir à des résultats satisfaisants, sous le rapport de la qualité, qu'en partant de vins peu acides et ayant une alcoolicité d'au moins 8 à 9°, ne semble donc présenter qu'un intérêt tout à fait secondaire pour les Vignerons du Centre. »

Dans la deuxième catégorie, nous trouvons en particulier les travaux récents et complets de P. JAULMES et G. HAMELLE portant le titre « Composition et emploi de vins concentrés par le froid à fort degré alcoolique » (*Ann. Tech. Agr.*, 3, 241 ; 1954).

La publication de cet important mémoire dans ces *Annales* nous dispense d'en citer les extraits significatifs. Nous nous contenterons de souligner le point de vue des auteurs. Pour ceux-ci, l'un des principaux avantages de ces vins concentrés est leur inaltérabilité ; de plus ils constituent des produits de base à usages particuliers, plus intéressants que les produits viniques de haut degré alcoolique. Il est évident qu'à ce point de vue le vin concentré est préférable au vin alcoolisé.

Ils notent aussi un curieux effet gustatif : la sensation d'un degré alcoolique bien plus faible que le degré réel, ce qui peut favoriser leur consommation directe.

Mais, d'après ces auteurs, ces vins concentrés offrent les graves inconvénients de ne pas conserver la saveur initiale du vin générateur, d'être vieillis prématurément et d'avoir perdu des constituants dont l'utilité alimentaire est indiscutable, tels que le tartre. Ils soulignent encore que le vin concentré risque de favoriser l'alcoolisme d'une façon qu'il est impossible de prévoir.

Enfin, il faut signaler d'autres recherches ayant eu ou ayant pour objet l'étude systématique de la concentration sans préoccupation fiscale ou technologique. C'est en particulier celles qui ont été réalisées à Narbonne par FLANZY et de SEZE en 1935-1936, puis par FLANZY, POUX, Mlle OURNAC, en 1952 (*Ind. Agr. et Alim.*, **70**, 759 ; 1953).

Rappelons les conclusions :

« La concentration d'un vin par le froid présente, à côté de l'avantage discutable d'augmenter son degré alcoolique, l'inconvénient de détruire l'harmonie des acides et en particulier le rapport $\frac{\text{acide tartrique}}{\text{acide malique}}$ et de diminuer par là sa bonne conservation ultérieure.

« On recherche, par la concentration, à pallier l'insuffisance de maturation provoquée par de mauvaises conditions climatiques.

« Mais, au cours de la maturation naturelle, se poursuit simultanément un enrichissement en sucre, d'où augmentation du degré alcoolique et diminution de l'acide malique.

« On voit que si la concentration agit, en ce qui concerne l'alcool, dans le même sens que le phénomène naturel, elle agit en sens inverse en ce qui concerne l'acide malique. *Ici le phénomène biologique est l'inverse du phénomène physique qu'est la concentration.*

« Il n'est donc pas étonnant que les vins obtenus naturellement soient totalement différents, au point de vue organoleptique, composition et tenue, des vins concentrés par le froid. De tels résultats obligent à faire, sur cette pratique, les plus grandes réserves. »

Par ailleurs, dans le Rapport général *Problèmes généraux scientifiques et techniques d'Œnologie* que nous avons présenté et défendu au VIIe Congrès International de la Vigne et du Vin à Rome (13-20 septembre 1953) nous disions en conclusion du chapitre *Traitement des vins ; action du froid* :

« Le procédé de concentration du vin par le froid, rompant l'harmonie naturelle du vin est incompatible avec la poursuite d'une politique de qualité.

« Le cas des vins destinés à une consommation courante dans des régions fort éloignées des centres de production a encouragé leur concentration.

« Les productions correspondantes étaient critiquables et pour leur valeur gustative, et pour leur comportement biologique. »

Et, préoccupés de certaines destinations de ces vins, ainsi enrichis, nous ajoutions :

« Les réalisations techniques, possibles actuellement, permettraient d'envisager la production satisfaisante, non pas de vins concentrés, mais de concentrés de jus de raisin qui pourraient alors servir à l'élaboration des vins dans les centres mêmes de consommation. Le problème est donc posé de savoir s'il est préférable, pour ces cas particuliers, de préparer des concentrés de jus de raisin ou des vins concentrés.

« Il est bien évident que le problème de la concentration des vins ne peut être envisagé que pour des cas d'espèces fort limités. Même pour ceux-ci, il n'est pas du tout certain que l'utilisation de moûts concentrés ne soit pas préférable aux vins concentrés. »

Et nous terminions en disant :

« Dans la généralité des cas ce procédé dénature le vin. Cette dénaturation ne permet pas d'accorder au produit obtenu les caractères et privilèges dont bénéficie le vin naturel. C'est pourquoi une politique de qualité bien comprise doit déconseiller la fabrication généralisée de ces boissons concentrées. »

Mais en rapprochant nos propres études, d'ordre physiologique, des travaux que nous venons de citer, on voit qu'à tout prendre, la concentration du vin est préférable à son alcoolisation, et que l'emploi de moût concentré peut dans bien des cas, être préféré à la concentration des vins.

CHRONIQUE DES LIVRES :

CONSERVATION PAR LE FROID DES DENRÉES D'ORIGINE VÉGÉTALE [1]

PAR

R. ULRICH

Le livre du Pr R. Ulrich, professeur à la Faculté des Sciences de Paris, directeur du Laboratoire de Biologie de la Station du Froid de Bellevue (C.N.R.S.) vient heureusement enrichir la série des volumes de l'*Encyclopédie du Froid*. Il comble un vide dans la littérature scientifique française.

L'auteur, spécialiste de la biologie des fruits, aborde en physiologiste le problème de la conservation par le froid des denrées d'origine végétale. Cette tendance, soit dit en passant, étant complètement dans la ligne suivie par le Comité Directeur de ces Annales, confère déjà à cet ouvrage une place de choix dans la bibliographie de cette revue.

Les grandes divisions de ce travail sont les suivantes :

I. — Quelques données biologiques sur les produits d'origine végétale conservés en frigorifique.
II. — Les effets généraux du froid sur les organes végétaux.
III. — Généralités sur l'utilisation pratique du froid dans la réfrigération des produits végétaux.
IV. — Les conditions optima de réfrigération des produits végétaux. Leur recherche expérimentale.
V. — Conditions de réfrigération particulières aux fruits frais.
VI. — Conditions de réfrigération particulières aux légumes.
VII. — La réfrigération des organes végétaux autres que les fruits et légumes et le traitement des plantes entières.
VIII. — La réfrigération des produits manufacturés d'origine végétale.
IX. — La congélation rapide des produits d'origine végétale.
X. — Cryoconcentration et cryodessiccation.

Les chapitres IV, V et VI en particulier, logiquement ordonnés et richement documentés, forment un guide précieux pour les producteurs ou les utilisateurs. Y sont plus particulièrement traités : la réfrigération des pommes, poires, prunes, cerises, pêches, abricots, fraises, raisins, châtaignes, noix, agrumes, bananes, ananas, en ce qui concerne les fruits, et la réfrigération des oignons, pommes de terre, carottes, choux, salades, épinards, céleri, asperges, tomates, concombres, melons, pois, haricots, champignons, etc., en ce qui concerne les légumes.

Chacune de ces espèces est étudiée selon un même plan qui comprend notamment :

1° Classement des variétés en fonction de leur durée de conservation et de leur résistance au froid.

[1] Librairie J. B. Baillière et Fils. Paris.

2° Les conditions de développement du fruit sur pied susceptibles d'influencer sa conservation ultérieure (terrain, engrais, irrigation etc.).

3° Les conditions optima de la récolte.

4° Les conditions optima de l'entreposage dans l'air ou en atmosphère contrôlée.

5° L'évolution normale des fruits en chambre froide.

6° Les accidents de l'entreposage et les moyens de les éviter.

7° Les meilleures conditions de la maturation complémentaire lorsque celle-ci est nécessaire.

8° La durée limite de la période pendant laquelle le fruit est vendable après avoir quitté la chambre froide.

Cette simple énumération montre bien le guide précieux que constitue cet ouvrage pour tous les professionnels du froid dans l'industrie de la préparation et de la conservation des produits végétaux.

La précision des faits, leur explication, tout ce faisceau de renseignements, fera en sorte que cet ouvrage leur sera indispensable s'ils veulent opérer dans les conditions les plus sûres et les plus avantageuses.

Mais cet ouvrage offre pour les chercheurs une qualité précieuse. En dehors de toutes ces précisions techniques qu'ils doivent bien connaître, et que M. ULRICH leur dispense, cet ouvrage leur apporte une abondante bibliographie technique et scientifique, rassemblée par chapitre. Par sa présentation, son contenu, le biologiste et le physiologiste sont à même de retrouver les sources mêmes de l'objet de leurs recherches et tout l'enseignement qui leur est indispensable pour faire progresser la connaissance de l'action du Froid sur l'évolution et la conservation des produits végétaux.

En résumé, ce livre intéresse aussi bien ceux qui, par leur activité agricole, ou industrielle, s'occupent de l'entreposage frigorifique des denrées végétales, que ceux qui, par leur activité scientifique, peuvent être amenés à étudier un problème de biologie végétale en relation avec l'action du froid. Il s'impose aux uns et aux autres.

Michel FLANZY

Le Directeur-Gérant : B. LACLAVIÈRE.

Imprimerie BUSSIÈRE à Saint-Amand (Cher), France. — 3-6-1955.
Dépôt légal: 2e trimestre 1955 *N° d'impression: 778*

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE DE LA FORMATION DES PRODUITS SECONDAIRES DE LA FERMENTATION ALCOOLIQUE *(Suite)*

PAR

M. LAFON

Chapitre IV

ÉTUDE DE L'ÉVOLUTION DE LA TENEUR EN ÉTHANAL AU COURS DE LA FERMENTATION

L'éthanal formé dans le processus de la fermentation selon le schéma de Gay-Lussac ne peut s'accumuler dans le milieu, car il est réduit au fur et à mesure de sa formation. Au contraire, l'éthanal issu de la fermentation glycéropyruvique s'accumule plus ou moins suivant la vitesse avec laquelle il est utilisé par les enzymes responsables de la formation des produits secondaires.

La teneur en éthanal au cours de la fermentation est en rapport avec deux facteurs : le taux de la fermentation glycéropyruvique et la vitesse avec laquelle il est utilisé. Cette teneur doit donc éclairer les mécanismes dans lesquels est impliqué l'éthanal et nous lui avons consacré une étude systématique. Quelques résultats ont déjà été publiés (121).

Nous avons d'abord suivi l'évolution de l'éthanal au cours des fermentations provoquées par deux levures *Saccharomyces ellipsoïdeus*. Une souche avait été isolée d'un moût de Sauternes et l'autre de Saint-Émilion. Ces essais ont été faits avec deux milieux : un moût de raisin ayant 153 g de sucre par litre et un muté désulfité par barbotage de vapeur d'eau ayant 250 g de sucre et 58 mg d'acide sulfureux total. La fermentation du sucre a été suivie par l'analyse, la multiplication des levures par numération cellulaire, et nous dosions l'éthanal par la méthode Jaulmes-Espezel après distillation à pH 9.

Nous avons conduit nos expériences dans les deux conditions d'aération habituelles : flacons obturés d'un tampon d'ouate et flacons bouchés d'un dispositif à tube effilé (réalisant un état d'anaérobiose suffisant lorsque la fermentation est assez rapide, ce qui est toujours le cas des

levures elliptiques). Les résultats obtenus permettent de construire les courbes d'évolution de l'éthanal en fonction du sucre fermenté (fig. 1 et 2).

Nous constatons en premier lieu qu'il se forme davantage d'éthanal pour la même quantité de sucre fermenté, dans le milieu qui contenait de l'anhydride sulfureux. Ceci s'explique par le blocage sous forme de combinaison sulfitique d'une certaine quantité d'éthanal qui échappe ainsi aux enzymes de condensation et de dismutation ; en effet dans les conditions de notre dosage, cet éthanal combiné à l'anhydride sulfureux est titré en même temps que l'éthanal libre.

L'allure des courbes est partout la même : montée rapide au début de la fermentation, au moment où le taux de la fermentation glycéropyruvique est important pendant la phase d'induction. La vitesse de formation de l'éthanal est alors supérieure à la vitesse d'utilisation. Puis la courbe redescend après passage par un maximum pour 50 à 100 g de sucre fermenté. A ce moment on se trouve dans la phase normale de la fermentation ; le taux de la fermentation glycéropyruvique est beaucoup moins élevé et la vitesse d'utilisation de l'éthanal devient plus grande que celle de sa formation. La vitesse d'utilisation de l'éthanal semble être constante tout au long de la fermentation ; la fraction du sucre qui subit la fermentation glycéropyruvique diminue constamment.

La teneur maximum en éthanal est, dans tous les cas, plus élevée dans les fermentations conduites en anaérobiose. Ceci s'expliquerait par une utilisation ralentie de l'éthanal dans ces conditions, les enzymes provoquant la formation des produits secondaires étant sensibles à l'action de l'aération, comme nous l'avons vu dans le chapitre précédent.

Dans le cas des fermentations à l'air on observe, à la fin de la fermentation, une remontée de la courbe qui correspond à une formation d'éthanal par oxydation de l'alcool.

Les produits secondaires se formant à partir de l'éthanal issu de la fermentation glycéropyruvique, il est probable que les proportions de ces différents produits sont en rapport avec la quantité d'éthanal libre.

L'analyse des milieux fermentés dans cette expérience nous a donné des résultats que nous ne reproduirons pas ici, et qui sont tout à fait en accord avec ceux exposés au chapitre précédent.

Nous avons vu que la somme des produits secondaires (Σ) est toujours plus faible en anaérobiose qu'en milieu aéré, et nous constatons ici que la teneur maximum en éthanal libre est au contraire plus élevée à l'abri de l'air. La forte accumulation d'éthanal en anaérobiose n'a donc pas pour résultat une formation plus grande de produits secondaires.

On sait qu'il y a formation plus importante d'acide acétique et de 2,3-butanediol en anaérobiose. L'acide succinique au contraire est plus abondant en milieu aéré ; la teneur en enzyme de condensation succinique étant faible, en anaérobiose, il se fait peu d'acide succinique. Tout se

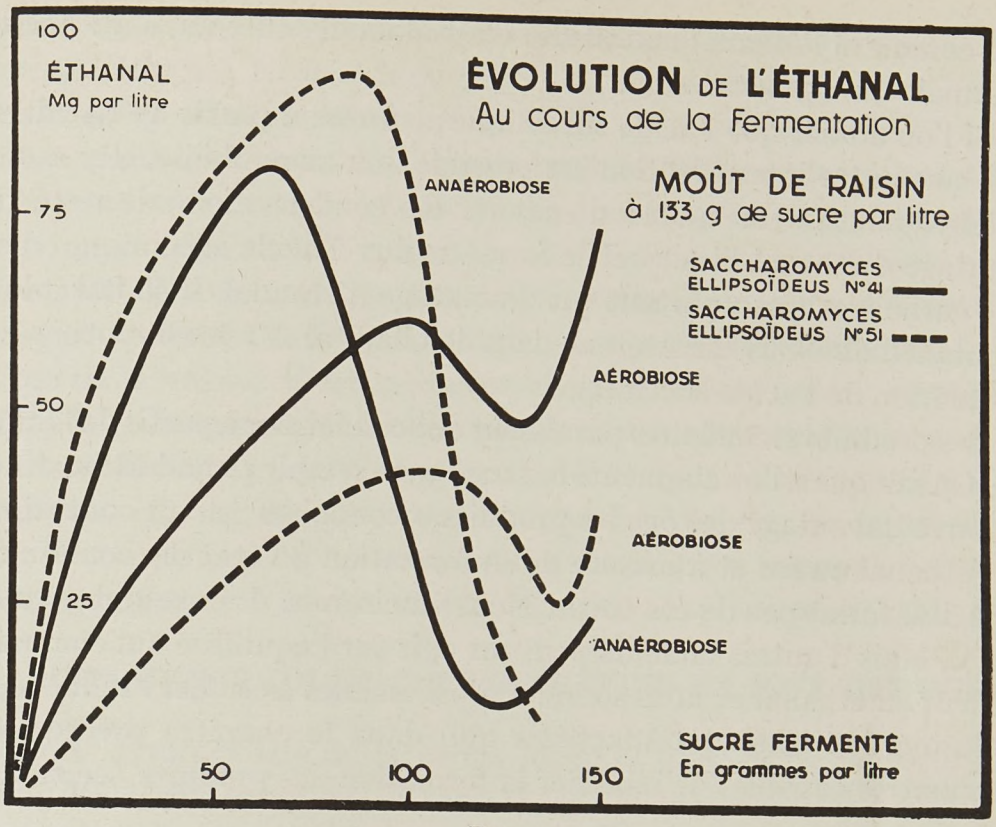

100
ÉTHANAL
Mg par litre
ÉVOLUTION DE L'ÉTHANAL
Au cours de la Fermentation
MOÛT DE RAISIN
à 133 g de sucre par litre
SACCHAROMYCES ELLIPSOÏDEUS N°41
SACCHAROMYCES ELLIPSOÏDEUS N°51
ANAÉROBIOSE
AÉROBIOSE
AÉROBIOSE
ANAÉROBIOSE
75
50
25
50
100
150
SUCRE FERMENTÉ
En grammes par litre

FIG. 1.

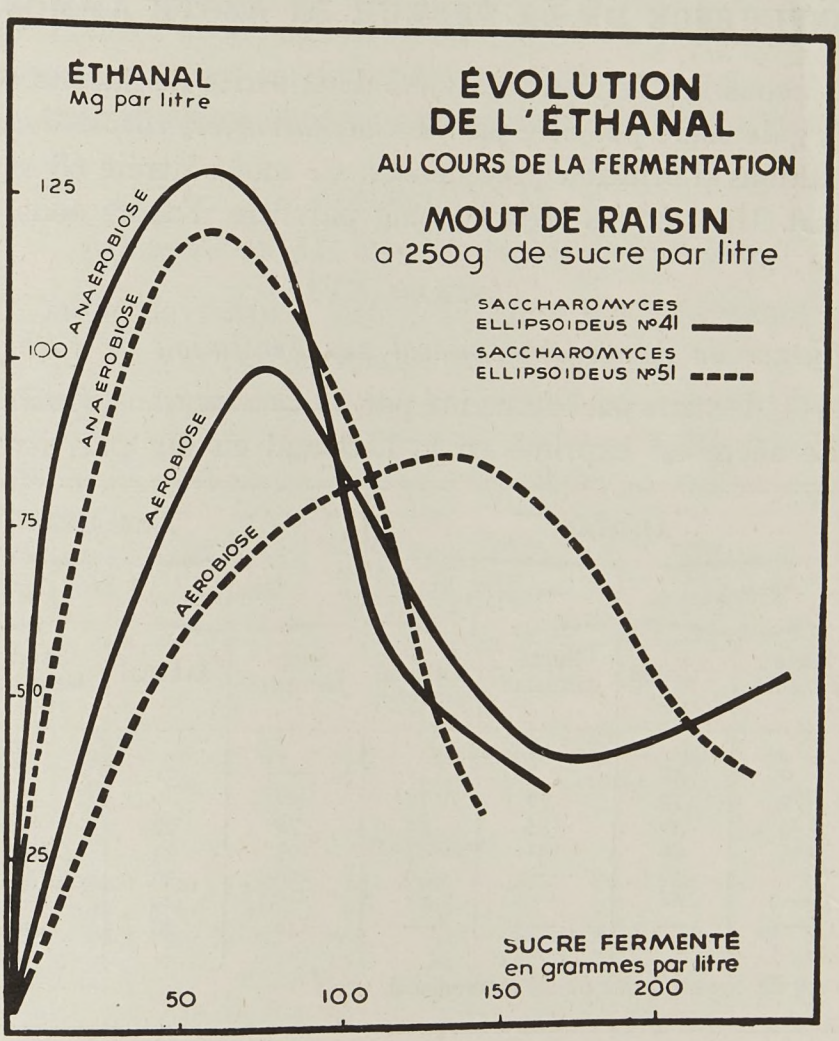

ÉTHANAL
Mg par litre
ÉVOLUTION DE L'ÉTHANAL
AU COURS DE LA FERMENTATION
MOUT DE RAISIN
a 250g de sucre par litre
SACCHAROMYCES ELLIPSOIDEUS N°41
SACCHAROMYCES ELLIPSOIDEUS N°51
125
100
75
50
25
ANAÉROBIOSE
ANAÉROBIOSE
AÉROBIOSE
AÉROBIOSE
50
100
150
200
SUCRE FERMENTÉ
en grammes par litre

FIG. 2

passe comme si l'éthanal non utilisé était alors dismuté en acide acétique ou formait du 2,3-butanediol.

Si l'on admet que l'acide succinique se forme à partir de l'acide acétique, une autre interprétation est possible : en anaérobiose, il y a moins d'aldéhydomutase et moins d'enzyme de condensation ; il reste donc davantage d'éthanal libre et il se forme moins d'acide succinique ; l'activité « carboligasique » portant sur davantage d'éthanal, il se fait plus de 2,3-butanediol. Nous discuterons dans le chapitre VI les hypothèses sur la formation de l'acide succinique.

Les produits secondaires paraissent donc se former à partir de l'éthanal libre. On sait que si l'on augmente ce taux, par exemple par addition directe, on trouve davantage de tous les produits secondaires ; si, au contraire, on fixe l'éthanal au fur et à mesure de sa formation à l'état de combinaison stable, il se forme peu de ces corps. Nous en citerons des exemples au chapitre V. Mais d'autres facteurs peuvent agir sur l'équilibre qui commande la teneur en éthanal et nous sommes ainsi amenés à étudier l'influence sur l'évolution de l'éthanal des facteurs qui, dans le chapitre précédent, se sont montrés capables de modifier la formation des produits secondaires.

I. — INFLUENCE DE LA TENEUR EN AZOTE AMMONIACAL

Nous avons fait fermenter à 25°C deux séries de flacons d'un moût ayant 145 g de sucre par litre par un *Saccharomyces ellipsoïdeus* dans les deux conditions d'aération précédentes. Ce moût titrait 68 mg d'azote ammoniacal. Une série a reçu 100 mg par litre d'azote sous forme de

Tableau XVI

Influence de l'azote ammoniacal sur l'évolution de l'éthanal.

Moût à 145 g de sucre par l fermenté par *Saccharomyces ellipsoïdeus* n° 41.
Le sucre est exprimé en g, l'éthanal en mg par litre.

Temps	Aérobiose				Anaérobiose			
	Témoin		+ NH_4 (1)		Témoin		+ NH_4 (1)	
	Sucre fermenté	Éthanal	Sucre fermenté	Éthanal	Sucre fermenté	Éthanal	Sucre fermenté	Éthanal
36 h	6	31	4	31	—	21	—	20
60 h	70	70	70	77	30	87	33	88
4 j	123	31	135	34	70	97	81	94
5 j	141	40	141	47	107	63	114	58
6 j	—	58	—	36	128	36	133	40
7 j	—	88	—	41	—	29	—	31
9 j	—	—	—	—	140	28	140	28

(1) 100 mg de N sous forme de sel ammoniacal.

sulfate d'ammonium et l'autre a servi de témoin. Nous avons suivi l'évolution de l'éthanal, le sucre fermenté et la population des levures, et nous avons dosé les produits secondaires à la fin de la fermentation.

Les résultats rassemblés dans le tableau XVI montrent que l'addition d'azote ammoniacal ne modifie en rien l'évolution de l'éthanal, ni le maximum atteint. Si l'on trace les courbes de cette évolution, elles se confondent. D'autre part, la teneur en cation ammonium n'a pratiquement pas d'effet sur la formation des divers produits secondaires. L'accélération de la vitesse de fermentation elle-même a été faible : au plus une dizaine de g de sucre d'écart. La population des levures est un peu plus forte dans le moût enrichi, surtout au début de la fermentation. Le troisième jour, elle est de 57 000 cellules par mm^3 au lieu de 50 000 à l'air et de 17 000 au lieu de 14 000 à l'abri de l'air. Pour la population finale, l'effet est moins net : 72 000 au lieu de 70 000 et 41 000 au lieu de 34 000.

II. — INFLUENCE DE LA CONCENTRATION EN IONS HYDROGÈNE

Nous avons étudié de la même façon et avec la même levure l'influence de la concentration en ions H^+ sur la teneur en éthanal libre au cours de la fermentation d'un moût à 210 g de sucre par litre par *Saccharomyces ellipsoïdeus* n° 41, dans les deux conditions d'aération habituelles. Ces fermentations ont été conduites à 6 pH différents : 2,7 ; 3,2 ; 4,0 ; 5,0 ; 7,0 ; et 8,0. Les résultats obtenus sont rassemblés dans le tableau XVII.

Tableau XVII

Influence du pH sur l'évolution de l'éthanal.

Moût de raisin à 210 g de sucre par l fermenté par *Saccharomyces ellipsoïdeus* n° 41.
Sucre exprimé en g par l ; éthanal en mg par litre.

Temps en jours	pH 2,7		pH 3,2		pH 4,0		pH 5,0		pH 7,0		pH 8,0	
	Sucre fermenté	Éthanal	Sucre fermenté	Éthanal	Sucre fermenté	Éthanal	Sucre fermenté	Éthanal	Sucre fermenté	Éthanal	Sucre fermenté	Éthanal
Aérobiose												
2	34	69	38	72	38	67	32	54	—	—	—	—
4	120	83	130	95	118	84	104	82	26	32	—	—
6	184	103	186	107	180	123	162	81	100	96	62	112
11	—	—	—	—	—	—	—	—	139	86	108	110
Anaérobiose												
2	26	81	26	89	26	90	17	81	—	—	—	—
4	92	108	92	101	88	102	70	99	—	—	—	—
6	132	58	139	47	139	49	112	56	56	42	28	53
11	187	39	191	33	185	34	184	41	74	48	50	50
19	—	—	—	—	—	—	—	—	143	50	112	70

Nous constatons que dans l'intervalle de pH 2,7 à pH 5,0, la concentration en ions H^+ n'a pas d'influence nette sur l'évolution de l'éthanal. Mais à pH 7 et 8, les teneurs maxima en éthanal sont plus faibles qu'aux fortes acidités, au moins lorsqu'on considère la série fermentant en anaérobiose, car en milieu aéré les phénomènes d'oxydation sont certainement à l'origine d'une partie de l'éthanal. Nous avons vu pourtant que le taux de fermentation glycéropyruvique augmente avec le pH, mais nous constatons ici que la vitesse d'utilisation de l'éthanal augmente encore plus rapidement. Une faible concentration en ions H^+ favorise en effet les mécanismes des fermentations secondaires et il y a en milieu alcalin augmentation du taux des produits secondaires, en particulier accumulation de l'acide acétique.

III. — INFLUENCE DE LA TEMPÉRATURE

Dans ces essais, nous avons fait fermenter un moût ayant 145 g de sucre par litre par un *Saccharomyces ellipsoïdeus*, dans les deux conditions habituelles d'aération et à différentes températures : 15°C, 20°C, 25°C, 30°C, 35°C. Nous avons suivi comme précédemment l'évolution de l'éthanal en fonction du sucre fermenté.

Les résultats obtenus sont rassemblés dans le tableau XVIII.

Tableau XVIII

Influence de la température sur l'évolution de l'éthanal.

Moût de raisin à 145 g de sucre fermenté
par *Saccharomyces ellipsoïdeus* n° 41.
Sucre en g, éthanal en mg par litre.

Temps en jours	15°C		20°C		25°C		30°C		35°C	
	Sucre fermenté	Éthanal	Sucre fermenté	Éthanal	Sucre fermenté	Éthanal	Sucre fermenté	Éthanal	Sucre fermenté	Éthanal
Aérobiose										
2	—	—	—	—	8	29	42	55	34	62
3	—	—	21	43	68	57	82	40	73	47
4	—	—	71	82	116	31	123	37	98	38
7	36	41	144	46	144	69	144	69	—	54
9	87	64	—	—	—	—	—	—	126	58
11	125	62	—	—	—	—	—	—	—	—
Anaérobiose										
2	—	—	—	—	8	32	50	77	22	76
3	—	—	16	46	50	77	90	41	50	106
4	—	—	42	92	84	75	127	26	81	62
7	30	44	115	29	134	27	144	22	103	36
9	68	78	—	—	—	—	—	—	—	—
14	117	36	—	—	—	—	—	—	—	—

La température paraît n'avoir que peu d'influence sur la courbe d'évolution de l'éthanal ; il semble cependant qu'à 35°C, les teneurs en éthanal soient plus fortes au début de la fermentation, ce qui correspondrait à un taux plus élevé de fermentation glycéropyruvique. On ne peut pas mettre en évidence une variation régulière du taux d'éthanal libre avec la température.

L'élévation de la température semble agir de deux façons : elle augmente le taux de la fermentation glycéropyruvique et donc de l'éthanal libre, mais d'un autre côté elle favorise certaines réactions de formation des produits secondaires et a ainsi tendance à diminuer l'éthanal.

IV. — INFLUENCE DE LA TENEUR EN SUCRE

Nous avons fait fermenter deux milieux à différentes richesses en sucre et nous avons suivi l'évolution de la teneur en éthanal et la quantité de sucre fermenté. Nous avons opéré dans les deux conditions d'aération habituelles, avec un moût de raisin ajusté par des additions de saccharose à 200, 300 et 400 g par litre, et un milieu synthétique préparé avec 56, 110, 220, 350 et 450 g de saccharose par litre.

Les chiffres relatifs aux fermentations aérobies sont rassemblés dans les tableaux XIX et XX, les résultats des fermentations anaérobies étant illustrés par les courbes des figures 3 et 4.

Tableau XIX

Influence de la richesse en sucre sur l'évolution de l'éthanal.

Moût de raisin. Fermentation en aérobiose
par *Saccharomyces ellipsoïdeus* n° 41.
Sucre exprimé en g, éthanal en mg par litre.

Temps en jours	Teneurs en sucre au départ					
	200		300		400	
	Sucre fermenté	Éthanal	Sucre fermenté	Éthanal	Sucre fermenté	Éthanal
2.....	36	65	35	79	13	82
3.....	75	46	56	101	46	138
4.....	102	46	75	80	66	142
6.....	147	50	122	70	112	107
8.....	188	53	157	64	143	85
11.....	—	—	204	59	175	73

La teneur en éthanal présente un maximum d'autant plus élevé, et même elle reste durant tout le cours de la fermentation d'autant plus élevée, que la richesse en sucre du milieu est plus grande. En d'autres

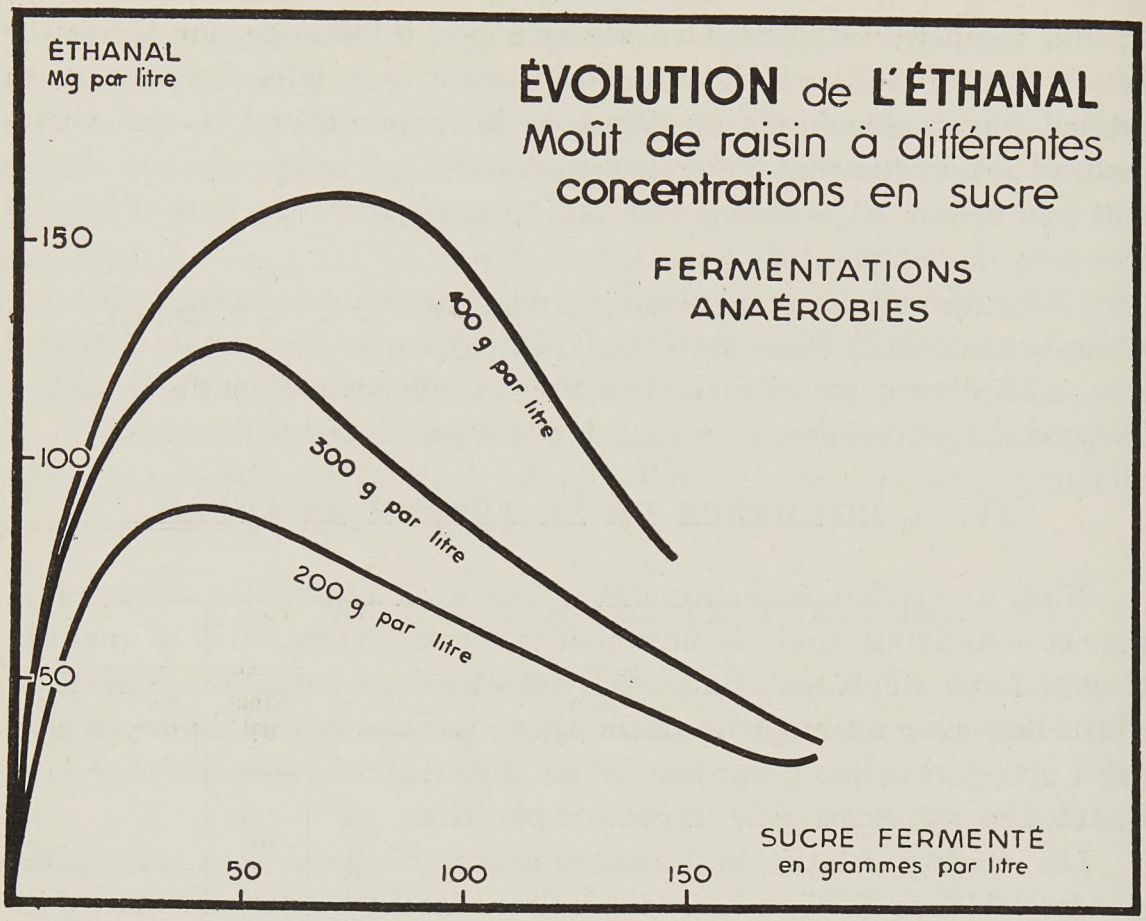

ÉTHANAL
Mg par litre
ÉVOLUTION de L'ÉTHANAL
Moût de raisin à différentes concentrations en sucre
FERMENTATIONS ANAÉROBIES
150
100
50
400 g par litre
300 g par litre
200 g par litre
50
100
150
SUCRE FERMENTÉ
en grammes par litre

FIG. 3

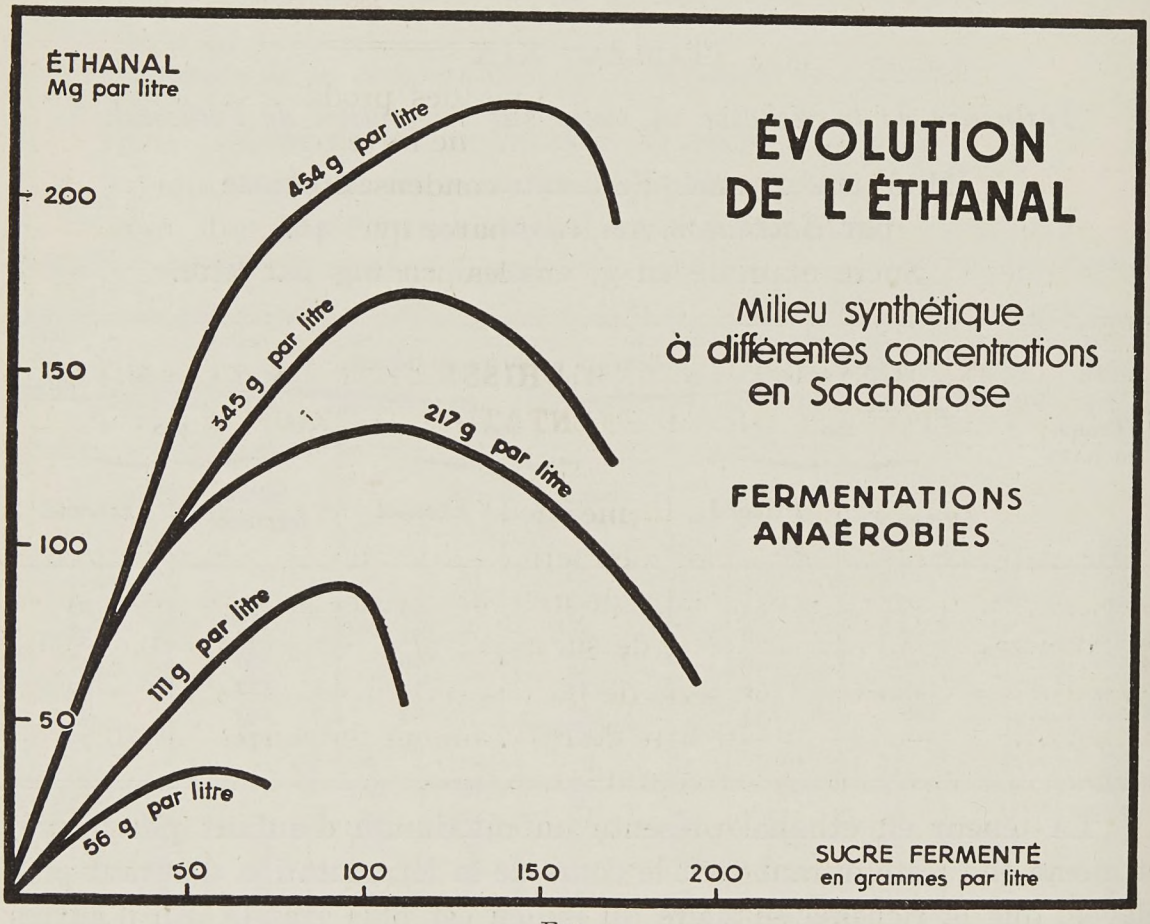

ÉTHANAL
Mg par litre
ÉVOLUTION DE L'ÉTHANAL
Milieu synthétique à différentes concentrations en Saccharose
FERMENTATIONS ANAÉROBIES
200
150
100
50
454 g par litre
345 g par litre
217 g par litre
111 g par litre
56 g par litre
50
100
150
200
SUCRE FERMENTÉ
en grammes par litre

FIG. 4

termes, la fermentation d'une certaine quantité de sucre laisse dans le milieu d'autant plus d'éthanal que celui-ci est plus sucré. La pente de la courbe dans sa première partie est d'autant plus forte que la concentration initiale en sucre est plus grande.

TABLEAU XX

Influence de la richesse en sucre sur l'évolution de l'éthanal.

MILIEU SYNTHÉTIQUE. Fermentation en aérobiose.
Saccharomyces ellipsoïdeus n° 41.
Sucre exprimé en g, éthanal en mg par litre.

Temps en jours	Teneurs en sucre au départ									
	56		110		220		250		450	
	Sucre fermenté	Éthanal	Sucre fermenté	Éthanal	Sucre fermenté	Éthanal	Sucre fermenté	Éthanal	Sucre fermenté	Éthanal
2	56	12	74	54	72	95	55	72	—	—
3	—	—	97	87	125	130	77	168	38	81
4	—	—	104	67	177	106	133	219	109	182
6	—	—	110	60	217	52	184	198	117	282
8	—	—	—	—	—	—	226	136	142	290
12	—	—	—	—	—	—	269	84	184	251
23	—	—	—	—	—	—	288	69	194	225

On avait déjà observé que la somme des produits secondaires est plus importante en milieu plus sucré et qu'une forte teneur en sucre favorise la fermentation glycéroacétique et la condensation acétoïnique. Mais il semble aussi que l'éthanal s'accumule parce que la grande richesse en sucre freine l'utilisation de l'éthanal vers les produits secondaires.

V. — INFLUENCE D'UN ENRICHISSEMENT EN THIAMINE ET D'UN ACTIVEUR DE FERMENTATION D'ORIGINE FONGIQUE

Nous avons étudié de la même façon l'influence sur l'évolution de l'éthanal dans un moût de raisin en fermentation d'une addition de thiamine et d'une addition de poudre de mycélium séché d'*Aspergillus niger*. Le moût avait au départ 145 g de sucre par litre. On opérait dans deux conditions d'aération. Une série de flacons servait de témoin, une autre recevait au départ 1 mg par litre de thiamine, et la troisième était additionnée de 1 g par litre d'activeur d'*Aspergillus*.

Les courbes de la figure 5 représentent l'évolution de l'éthanal libre en fonction du sucre fermenté.

Tout d'abord précisons que l'addition de vitamine B_1, mais surtout

l'introduction du mycélium desséché, ont accéléré la fermentation : au troisième jour, l'avance est de 25 g pour B_1, de 50 g pour le mycélium. A l'abri de l'air, la fermentation n'a été complète que dans les fermentations activées ; le témoin est resté sucré.

Nous voyons par ailleurs que la thiamine n'a pas eu d'effet sur l'évolution de l'éthanal ; les courbes des témoins et celles de la fermentation avec B_1 sont à peu près superposables. L'enrichissement du moût en vitamine B_1 ne modifie pas non plus la formation des produits secondaires. Ceci prouve que l'activité de la carboxylase du témoin, qui n'était pas dépourvu de thiamine, était largement suffisante.

La poudre de mycélium séché d'*Aspergillus niger* modifie au contraire profondément la courbe d'évolution de l'éthanal ; celle-ci monte

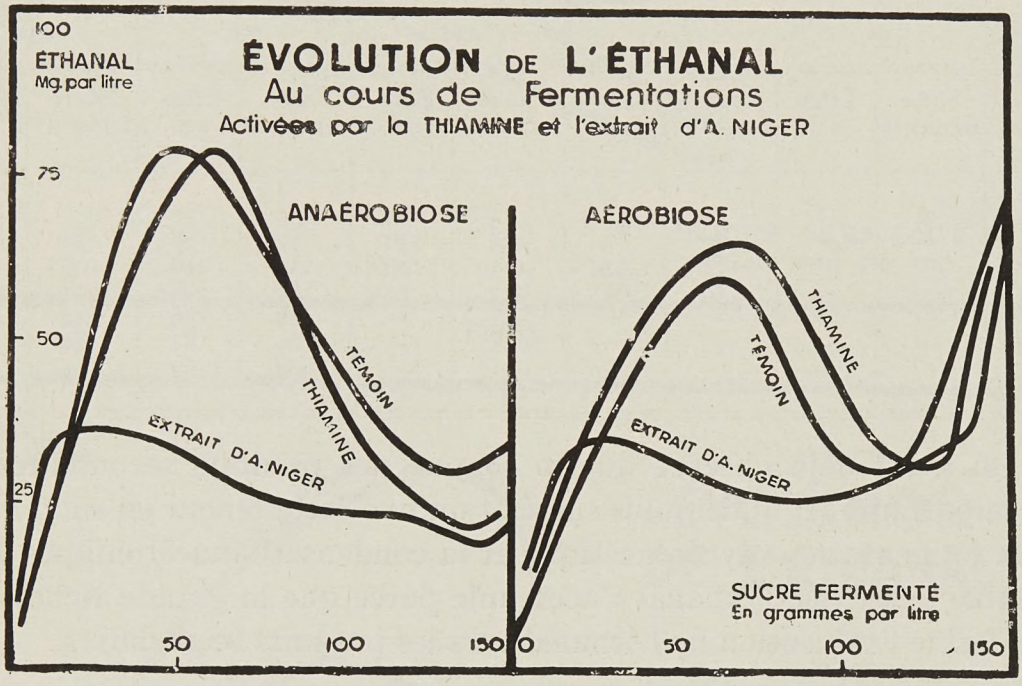


Fig. 5

plus brutalement au départ, ce qui correspond à une augmentation du taux de la fermentation glycéropyruvique, mais le maximum atteint est très inférieur à celui du témoin : 34 mg par litre au lieu de 75 mg par exemple à l'abri de l'air. Puis la courbe présente un palier aux environs de 25 mg par litre. On remarque tout de suite que l'addition de cet activeur supprime la différence existant entre fermentations à l'air et à l'abri de l'air ; les deux courbes sont en effet pratiquement identiques et de même les variations des produits secondaires dues aux différences d'aération sont pratiquement supprimées en présence d'activeur. Cette poudre de mycélium contient certainement des enzymes qui, ajoutant leur action à ceux de la levure, augmentent la vitesse d'utilisation de l'éthanal et en conséquence diminuent la teneur en éthanal libre du milieu. De même

on peut penser que les enzymes contenus dans cette poudre remplacent ceux qui manquent à la levure travaillant en anaérobiose et par suite suppriment les différences avec les fermentations à l'air.

VI. — ÉVOLUTION DE L'ÉTHANAL AU COURS DE LA FERMENTATION PAR TROIS ESPÈCES DE LEVURES

Nous avons également suivi les variations de la teneur en éthanal en fonction du sucre fermenté au cours de la fermentation d'un moût de raisin à 205 g de sucre par litre par un *Saccharomyces ellipsoïdeus* déjà étudié et par deux autres levures appartenant à des genres différents : *Saccharomycodes bisporus* et *Torulaspora rosei*. Nous avons comparé ces levures, car au point de vue de la formation des produits secondaires, elles se différencient profondément. Le *Saccharomycodes* est une levure très succinogène et forme par contre peu d'acide acétique et très peu de 2,3-butanediol. *Torulaspora rosei* ne forme pratiquement pas d'acide acétique (tableau XXI).

Les chiffres obtenus dans les dosages successifs d'éthanal nous ont

Tableau XXI

Produits secondaires formés par les trois espèces de levures étudiées.

Moût de raisin, 205 g de sucre par litre.
Les chiffres sont des millimolécules par litre.

	Glycérol *g*	Acide acétique *a*	Acide succinique *s*	2,3 butanediol *b*	Éthanal *h*	Σ	100 Σ/*g*	100 *a*/*s*	1 000 *b*/*g*
Saccharomyces ellipsoïdeus									
Air	*102*	12,2	9,2	5,6	0,9	*77*	75	132	55
Abri de l'air	*80*	15,0	6,4	6,2	0,9	*69*	86	234	77
Saccharomycodes bisporus									
Air	*85*	9,2	17,2	1,6	1,2	*107*	125	53	188
Abri de l'air	*73*	3,6	13,5	1,3	0,8	*77*	104	27	178
Torulaspora rosei									
Air	*54*	0,6	11,5	4,3	1,2	*64*	118	5	80
Abri de l'air	*49*	0,6	8,8	3,0	0,4	*49*	100	7	61

permis de tracer les courbes de la figure 6. Nous pouvons constater que ces trois levures se différencient nettement en ce qui concerne cette évolution.

En effet, au contraire de ce qui se passe pour *Saccharomyces ellipsoïdeus*, les deux autres levures forment davantage d'éthanal en aérobiose

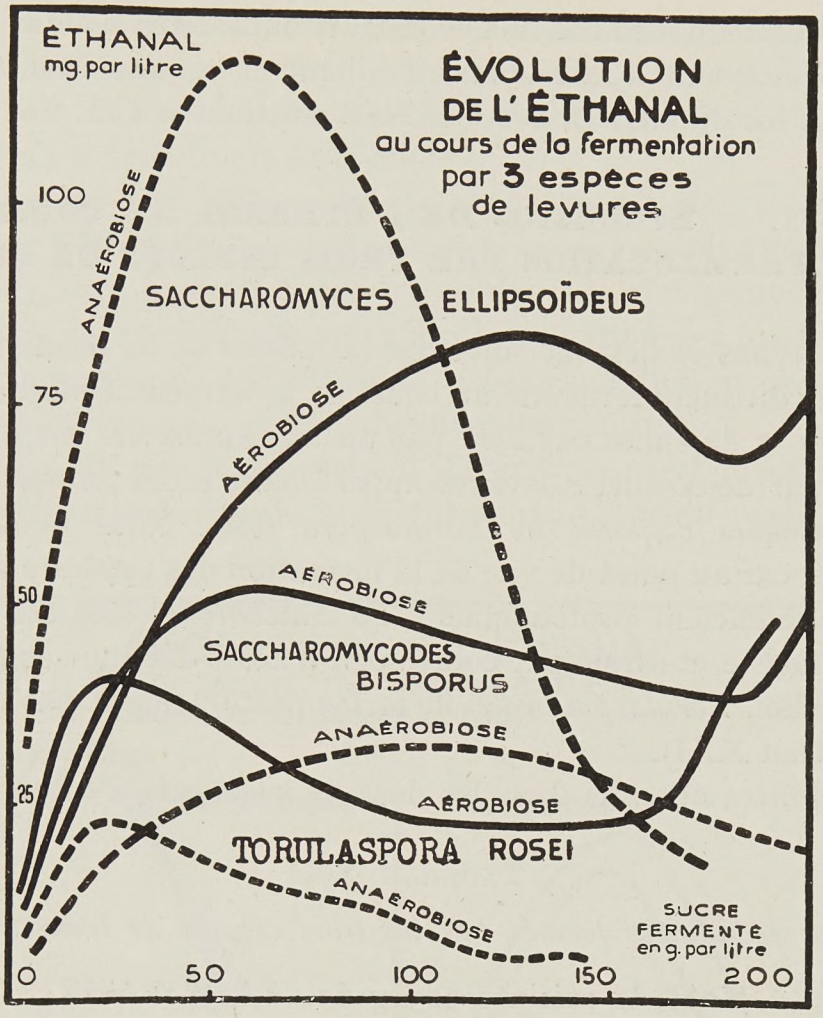


Fig. 6

qu'à l'abri de l'air. Ces deux levures en forment d'ailleurs beaucoup moins que la levure elliptique. Les courbes obtenues sont plus aplaties, surtout celles de *Torulaspora rosei*. Tout se passe comme si l'éthanal ou son précurseur était utilisé beaucoup plus rapidement par ces levures que par la levure elliptique.

Nous retrouvons en somme ici, en particulier chez le *Saccharomycodes*, des résultats que l'on peut rapprocher de ceux obtenus dans la fermentation activée par le mycélium d'*Aspergillus* : teneurs moins fortes en éthanal (qui paraissent correspondre à une utilisation plus rapide) et formation plus élevée d'acide succinique. Il est à remarquer que les teneurs les plus fortes en acide succinique correspondent toujours aux cas où l'accumulation de l'éthanal est la plus faible. Il en est encore de même dans le cas de *Saccharomyces ellipsoïdeus*, qui produit moins d'acide succinique lorsqu'il fermente en anaérobiose, condition dans laquelle il forme davantage d'éthanal. Ces faits sont en accord avec l'hypothèse qui fait découler l'acide succinique de l'éthanal et montrent qu'il se forme l'un des premiers parmi les produits secondaires.

VII. — CONCLUSIONS

En résumé, et nous y reviendrons plus longuement dans les conclusions générales, cette étude de l'évolution de l'éthanal au cours de fermentations conduites dans différentes conditions nous apporte des renseignements utiles. Certes l'éthanal n'apparaît qu'au bout de la chaîne des réactions et la seule connaissance de son évolution ne renseigne pas sur les mécanismes intimes. Mais ces observations sont en accord avec notre hypothèse sur le mode d'action des facteurs extérieurs de la fermentation qui favorisent électivement certaines réactions de formation des produits secondaires, donc orientent l'utilisation de l'éthanal. Elles confirment la distinction des deux phases de la fermentation : phase d'induction où le taux de la fermentation glycéropyruvique est très élevé, ce qui se traduit par une accumulation d'éthanal, et phase de pleine fermentation où ce taux diminue progressivement. Enfin, nous voyons la possibilité de faire varier les taux des produits secondaires en agissant sur la teneur en éthanal ou en acide pyruvique, possibilité qui est exploitée dans le chapitre suivant.

CHAPITRE V

FERMENTATIONS DÉVIÉES ET FORMATION DES PRODUITS SECONDAIRES

Nous avons vu au cours des chapitres précédents que les taux des produits secondaires de la fermentation alcoolique varient avec un grand nombre de facteurs. La relation quantitative établie au début de notre travail s'est révélée expérimentalement valable dans la plupart des cas, et l'étude de l'évolution de l'éthanal au cours de la fermentation nous a montré l'importance de ce corps dans ses relations avec les produits secondaires. Mais les équations chimiques de formation de ces derniers composés ne sont dans plusieurs cas que des équations globales, et le mécanisme de leur formation à partir de l'éthanal ou d'un de ses précurseurs n'est pas entièrement élucidé ; c'est en particulier le cas de l'acide succinique, de l'acétoïne et du 2,3-butanediol.

Nous avons essayé d'éclairer ces problèmes en étudiant les modifications que provoque, dans la composition des liquides fermentés, l'incorporation d'éthanal ou d'acide pyruvique ou encore d'acide acétique, par exemple. Le sens de la déviation de fermentation obtenue permet des déductions sur les réactions impliquées.

On a vu qu'on peut faire remonter l'idée de cette forme d'expérimentation à J.-B. DUMAS, qui proposait d'étudier la fermentation alcoo-

lique en en modifiant les résultats par une action chimique quelconque. C'est en fixant, d'après ce principe, l'éthanal d'une fermentation par addition de sulfite de sodium ou de dimédon que NEUBERG et REINFURTH (89) montrèrent l'équivalence entre glycérol et éthanal.

Plus récemment E. PEYNAUD (104) ajoutant progressivement de l'éthanal à une fermentation en marche, a montré que cette addition se traduisait par une augmentation des taux de 2,3-butanediol, d'acétoïne et des acides succinique et acétique et par une diminution du glycérol, fournissant ainsi une preuve de valeur à l'hypothèse de L. GENEVOIS.

Nous avons repris cette expérience et nous avons également étudié les fermentations déviées par addition d'acide pyruvique, d'acide acétique et d'acide formique.

I. — ADDITIONS D'ÉTHANAL AU COURS DE LA FERMENTATION

Nous avons fait fermenter à 25°C, un moût de raisin à 192 g de sucre par litre et de pH 3,61, dans les deux conditions d'aération plusieurs fois décrites. Une série de flacons servait de témoin, l'autre recevait au départ une addition de 84 mg par litre d'éthanal ; après le démarrage de la fermentation, on ajoutait progressivement de l'éthanal par doses de 300 à 600 mg par litre, plusieurs fois par jour au début, puis en espaçant les additions au fur et à mesure que l'activité de la fermentation diminuait. Chaque fois qu'une addition était faite les flacons témoins recevaient le même volume d'eau distillée stérile afin que la dilution finale soit la même. Nous avons ainsi ajouté 140 millimolécules d'éthanal par litre.

Afin d'évaluer les pertes possibles d'éthanal dues à un entraînement par le gaz carbonique dégagé, nous avons fait fermenter une troisième série de flacons que nous avions obturés d'un bouchon de liège paraffiné traversé d'un tube coudé à extrémité effilée, plongeant dans un flacon contenant de l'eau distillée et du bisulfite de sodium. Nous dosions tous les deux ou trois jours l'éthanal du barboteur, après distillation à pH 8. L'éthanal total entraîné de cette façon s'est révélé très faible : 0,21 mmol par litre pour le témoin et 0,18 mmol par litre pour le flacon recevant des additions d'éthanal. Les pertes d'éthanal par entraînement sont donc absolument négligeables dans le cas des fermentations à l'abri de l'air.

A la fin des fermentations, nous avons dosé les produits secondaires dans le liquide séparé du dépôt par décantation. Le tableau XXII expose les résultats obtenus pour les deux conditions d'aération. Dans les flacons additionnés d'éthanal, la proportion de la fermentation glycéropyruvique étant diminuée, nous avons calculé les taux des produits secondaires du témoin par rapport au glycérol de la fermentation déviée correspondante, de façon à ce que la différence de ces valeurs représente bien l'action de l'éthanal ajouté.

L'addition d'éthanal a pour résultat une augmentation de la formation d'alcool et de tous les produits secondaires, sauf du glycérol qui diminue. On le comprend aisément : la levure trouvant de l'éthanal dès le début de la fermentation, l'oxydoréduction normale de la réaction de GAY-LUSSAC débute beaucoup plus tôt et la phase d'induction pendant laquelle se forme la majorité du glycérol est réduite d'autant ; la fermentation normale est donc favorisée et il se forme davantage d'alcool. L'éthanal ajouté est utilisé par les enzymes responsables de la formation des produits secondaires et donne un supplément de chacun d'eux.

TABLEAU XXII

Fermentations déviées par des additions d'éthanal

Les chiffres sont des mmol par litre, sauf l'alcool et le sucre

	Aérobiose				Anaérobiose			
	Témoin	Chiffres rapportés au *g* de la fermentation déviée	+ 140 mmol d'éthanal	*Différence*	Témoin	Chiffres rapportés au *g* de la fermentation déviée	+ 140 mmol d'éthanal	*Différence*
Sucre restant	2,9		3,5		3,2		37,4	
Alcool	11°8		12°2		11°75		10°4	
Alcool total	11°95		12°4	+ 0°45	11°8		12°5	+ 0°7
Glycérol (*g*)	86		69	— 17	83		64	— 19
Acide acétique (*a*)	13,9	11,1	30,4	+ 19,3	17,0	13,1	29,0	+ 15,9
Acide succinique (*s*)	8,0	6,4	10,9	+ 4,5	4,9	3,8	6,4	+ 2,6
Acétoïne (*m*)	1,8	1,4	6,0	+ 4,6	—	—	—	—
2,3-butanediol (*b*)	4,3	3,4	19,1	+ 15,7	5,5	4,2	15,6	+ 11,4
Éthanal (*h*)	5,6	4,5	4,0	— 0,5	1,4	1,1	7,5	+ 6,4
Σ	81				69			
100 Σ/*g*	94				82			
Acide lactique	6,4		9,6	+ 3,2	8,7		12,0	+ 3,3
Acide citrique	1,4		1,7	+ 0,3	—	—	—	—

Nous vérifions ainsi d'une façon probante que les produits secondaires : acétoïne, 2,3-butanediol, acide acétique et acide succinique dérivent de l'éthanal. Il est certain que l'acétoïne se forme, en gros, par condensation de deux molécules d'éthanal :

$$2CH_3\,CHO \rightarrow CH_3\,CHOH\,CO\,CH_3.$$

Notre expérience démontre nettement que l'acide acétique se forme à partir de l'éthanal par dismutation :

$$2CH_3CHO + H_2O \rightarrow CH_3CH_2OH + CH_3COOH.$$

Enfin, nous avons la preuve que l'acide succinique dérive lui aussi de l'éthanal ; L. GENEVOIS l'avait formulé en 1935 de la façon suivante :

$$5CH_3CHO + 2H_2O \rightarrow COOHCH_2CH_2COOH + 3CH_3CH_2OH.$$

Nous essayerons de discuter le mécanisme possible de cette équation globale dans le chapitre suivant.

a) Bilan de l'éthanal

Du point de vue quantitatif, on peut essayer de faire un bilan de l'éthanal ajouté. Si l'on rapporte les teneurs en produits secondaires du témoin au taux de glycérol de la fermentation correspondante en présence d'éthanal, la somme $5\,\Delta s + 2\,\Delta a + \Delta b + \Delta h + 2\,\Delta m$ des différences entre témoin et fermentation déviée, représente une partie de l'éthanal ajouté. Le reste a donné de l'alcool éthylique : c'est la différence entre l'alcool formé réellement en plus et l'alcool équivalent à la diminution du glycérol, une mmol de glycérol correspondant à 2 mmol d'alcool. Cette réduction d'une aldéhyde ajoutée à la fermentation en l'alcool correspondant est un fait d'expérience, démontré également par PELTIER et PEYNAUD mais l'origine de l'hydrogène nécessaire reste obscure.

1° Dans le cas des fermentations en aérobiose, nous avons :

$$5\Delta s + 2\Delta a + \Delta b + \Delta h + 2\Delta m =$$
$$(5 \times 4{,}5) + (2 \times 19{,}3) + 15{,}7 - 0{,}5 + 9{,}2 = 86 \text{ mmol}$$

D'autre part, on calcule qu'une élévation du titre alcoolique de 0°45, correspond à la formation supplémentaire de 78 mmol d'éthanol. Or, 17 mmol de glycérol trouvées en moins correspondent à une formation d'éthanol plus faible de 34 mmol ; l'éthanol formé à partir de l'éthanal ajouté par les réactions qui ont donné naissance à l'excès de produits secondaires est égal à : $3\,\Delta s + \Delta a - \Delta b$, soit $(3 \times 4{,}5) + 19{,}3 - 15{,}7 = 17{,}1$ mmol. Enfin dans la fermentation témoin il s'est formé plus de glycérol que dans la fermentation déviée, donc plus de produits secondaires et en même temps d'éthanol correspondants à cet excès de glycérol ; cette petite quantité d'éthanol est égale à $3\delta s + \delta a - \delta b = (3 \times 1{,}6) + 2{,}8 - 0{,}9 = 6{,}7$ mmol.

L'alcool dû à l'éthanal ajouté est donc :

$$78 - 34 - 17{,}1 + 6{,}7 = 34 \text{ mmol.}$$

L'éthanal retrouvé sur 140 mmol ajoutées, est :

$$86 + 34 = 120 \text{ mmol.}$$

Il y a un déficit qui peut être dû à une évaporation au contact de l'air.

2° En anaérobiose, si l'on applique le même calcul, 63 mmol d'éthanal se retrouvent dans l'excédent de formation des produits secondaires :

$$5\Delta s + 2\Delta a + \Delta b + \Delta h = (5 \times 2{,}6) + (2 \times 15{,}9) + 11{,}4 + 6{,}4 = 63 \text{ mmol.}$$

D'autre part, l'élévation du degré alcoolique total (alcool + sucre) de 0°7, soit 122 mmol, se répartit de la façon suivante : 39 mmol résultent de la diminution dans la formation de glycérol et 12,3 mmol proviennent

de l'éthanal introduit qui forme un excès de produits secondaires ; la fermentation témoin avait une quantité supplémentaire d'alcool de 5,9 mmol correspondant à la formation des produits secondaires équivalents à l'excès de glycérol.

L'alcool dû à l'éthanal ajouté est donc :

$$122 - 39 - 12{,}3 + 5{,}9 = 77 \text{ mmol}$$

et l'éthanal retrouvé est :

$$63 + 77 = 140 \text{ mmol}$$

c'est-à-dire que nous retrouvons les 140 mmol d'éthanal ajoutées.

Il faut reconnaître que la difficulté d'un dosage assez précis de l'alcool éthylique ne permet pas d'avoir une confiance absolue en ces bilans.

b) Formation d'acide citrique

Nous constatons que le taux d'acide citrique augmente par addition d'éthanal, ce qui prouve bien que cet acide se forme à partir de ce corps ou d'un de ses précurseurs. L'hypothèse actuellement admise pour l'acide citrique de fermentation produit par les moisissures est qu'il provient de la condensation d'un dérivé acétyle « actif » avec l'acide oxalacétique formé par carboxylation de l'acide pyruvique :

$$CH_3COOH + COOH\,CH_2\,CO\,COOH \rightarrow \begin{array}{l} CH_2 - COOH \\ | \\ HOC - COOH \\ | \\ CH_2 - COOH \end{array}$$

Si l'on adopte le même mode de formation pour la levure, qui contient les enzymes nécessaires, sa variation interviendrait dans les calculs de notre bilan affectée du coefficient 3. La formation supplémentaire de 0,3 mmol, si elle est fort importante au point de vue théorique, n'a pratiquement pas d'incidence sur le bilan de l'éthanal ajouté.

c) Formation d'acide lactique

Il se forme davantage d'acide lactique dans les fermentations où l'on a ajouté de l'éthanal. Si l'on admet avec KIESSLING (56) que l'acide lactique se forme par simple hydrolyse de la phosphoglycéraldéhyde :

$$\begin{array}{l} CHO \\ | \\ CHOH \\ | \\ CH_2OPO_3H_2 \end{array} + H_2O \rightarrow \begin{array}{l} COOH \\ | \\ CHOH \\ | \\ CH_3 \end{array} + PO_4H_3$$

on peut penser que l'addition d'éthanal ralentissant la fermentation glycéropyruvique qui met en jeu deux molécules de phosphoglycéral-

déhyde au lieu d'une dans la fermentation normale, facilite de cette façon sa transformation en acide lactique. Citons encore à l'appui de cette hypothèse notre observation que l'addition de l'activeur d'*Aspergillus niger* augmente le taux d'acide lactique ; or, cet activeur agit en augmentant le taux des triosephosphates, phosphoglycéraldéhyde et phosphodihydroxyacétone. De plus, on observe d'après les chiffres de KIESSLING et ceux de PEYNAUD (101), que l'acide lactique se forme un peu plus vite en fin de fermentation, au moment donc où les triosephosphates disparaissent du milieu.

On pourrait également penser que l'acide lactique se forme par simple réduction de l'acide pyruvique :

$$CH_3\ CO\ COOH + H_2 \rightarrow CH_3\ CHOH\ COOH$$

L'addition d'éthanal pourrait agir en ralentissant la décarboxylation de cet acide, donc en favorisant sa réduction.

Deux faits paraissent s'opposer à cette interprétation : en premier lieu l'addition d'acide pyruvique à une fermentation, que nous étudions en détail dans le paragraphe suivant, n'a pas plus d'effet sur le taux d'acide lactique que l'addition d'éthanal, au contraire même, alors qu'elle devrait l'augmenter fortement. D'autre part, nous avons dosé l'acide lactique dans des fermentations activées par la thiamine. Nous n'avons pas observé de diminution de l'acide lactique, mais plutôt une légère augmentation. Il nous paraît donc plus probable que l'acide lactique dérive de la phosphoglycéraldéhyde.

II. — ADDITIONS D'ACIDE PYRUVIQUE AU COURS DE LA FERMENTATION

Nous avons conduit parallèlement à l'expérience précédente un essai dans lequel nous ajoutions progressivement du pyruvate de sodium et, afin de ne pas modifier le pH, la quantité d'acide sulfurique juste nécessaire pour libérer l'acide pyruvique. Nous avions les mêmes témoins et opérions dans les mêmes conditions de température, d'aération et avec les mêmes levures. Les flacons de cet essai recevaient avant le départ de la fermentation, 482 mg par litre de pyruvate de sodium. Après le départ de la fermentation, nous ajoutions 500 à 900 mg par litre de pyruvate, plusieurs fois par jour en période de pleine fermentation, puis moins fréquemment à mesure que l'activité de la fermentation diminuait. Le témoin recevait les mêmes volumes d'eau distillée stérile. Nous avons ainsi ajouté 83 mmol par litre d'acide pyruvique dans les deux essais, à l'air et à l'abri de l'air.

Ici encore l'éthanal entraîné par le dégagement du gaz carbonique dans un essai parallèle en barboteur a été tout à fait négligeable.

A la fin de la fermentation, nous avons dosé les divers produits secondaires sur le liquide décanté. Les résultats sont exposés dans le tableau XXIII. Nous y faisons également figurer les produits secondaires du témoin rapportés au taux de glycérol de la fermentation déviée.

Nous constatons que l'effet d'une addition d'acide pyruvique est de même sens que celui de l'addition d'éthanal, mais moins important. La quantité introduite était d'ailleurs plus faible. L'augmentation du degré alcoolique est moins élevée que lorsqu'on ajoute de l'éthanal. La diminution du glycérol et les augmentations des autres produits secondaires sont également plus faibles.

TABLEAU XXIII

Fermentations déviées par des additions d'acide pyruvique

Les chiffres sont des mmol par litre, sauf l'alcool et le sucre.

	Aérobiose				Anaérobiose			
	Témoin	Chiffres rapportés au *g* de la fermentation déviée	+ 83 mmol d'acide pyruvique	*Différence*	Témoin	Chiffres rapportés au *g* de la fermentation déviée	+ 83 mmol d'acide pyruvique	*Différence*
Sucre restant	2,9		6,4		3,2		45,3	
Alcool	11°8		12°05		11°75		9°8	
Alcool total	11°95		12°4	+ 0°45	11°90		12°3	+ 0°4
Glycérol (*g*)	86		69	— 17	83		74	— 9
Acide acétique (*a*)	13,9	11,1	20,8	+ 9,7	17,0	15,0	21,8	+ 6,8
Acide succinique (*s*)	8,0	6,4	10,0	+ 3,6	4,9	4,3	6,6	+ 2,3
Acétoïne (*m*)	1,8	1,4	2,5	+ 1,1	1,6	1,4	3,4	+ 2,0
2,3-butanediol (*b*)	4,3	3,4	7,5	+ 4,1	5,5	4,9	8,2	+ 3,3
Éthanal (*h*)	5,6	4,4	4,7	+ 0,3	1,4	1,2	3,2	+ 2,0
Σ	81				69			
100 Σ/*g*	94				82			
Acide lactique	6,4		8,8	+ 2,4	8,7		7,7	— 1,0
Acide citrique	1,4		1,8	+ 0,4	1,3		1,8	+ 0,5

Qualitativement, on peut dire que tout se passe comme si l'acide pyruvique ajouté était décarboxylé en éthanal ; son addition revient à une addition d'éthanal. Elle favorise la fermentation de GAY-LUSSAC et la formation de produits secondaires dérivés de l'éthanal.

Bilan de l'acide pyruvique. — Si l'on établit le bilan quantitatif de l'acide pyruvique ajouté, comme cela a été fait pour l'éthanal, on trouve des résultats satisfaisants.

Dans le cas de la fermentation en milieu aéré, la somme des produits secondaires correspondant à l'acide pyruvique est :

$$5\Delta s + 2\Delta a + \Delta b + \Delta h + 2\Delta m =$$
$$(5 \times 3{,}6) + (2 \times 9{,}7) + 4{,}1 + 0{,}3 + (2 \times 1{,}0) = 44 \text{ mmol.}$$

En y ajoutant la petite quantité d'acide citrique qui provient directement de l'acide pyruvique, cette somme devient 45 mmol environ. Or l'augmentation de 0°45 d'alcool, soit 78 mmol, s'explique pour 34 mmol par un taux de fermentation glycéropyruvique plus faible et pour 16,5 mmol par les réactions de formation de produits secondaires à partir de l'acide pyruvique ; il faut ajouter à cette augmentation d'alcool 6,5 mmol formées en plus dans la fermentation témoin en même temps que des produits secondaires équivalents à l'excès de glycérol.

L'alcool dû à l'acide pyruvique est finalement égal à 34 mmol et l'acide pyruvique retrouvé est 45 + 34 = 79 mmol, chiffre peu différent des 83 mmol ajoutées.

Dans le cas de la fermentation anaérobie, les mêmes calculs permettent de retrouver 80 mmol des 83 mmol d'acide pyruvique ajoutées.

Quoi qu'il en soit de la rigueur de ces bilans, ces expériences apportent la preuve formelle que l'acide pyruvique et l'éthanal sont bien, selon notre hypothèse de travail, les précurseurs des produits secondaires dans le milieu fermenté. La filiation a été établie pour l'acide citrique. L'étude suivante de la fermentation en présence d'acides gras volatils a pour but de préciser les produits formés intermédiairement, et doit permettre de tirer des conclusions sur les réactions mises en jeu.

III. — FERMENTATIONS EN PRÉSENCE D'ACIDES GRAS VOLATILS

a) Addition d'acide acétique

Nous avons conduit cet essai selon les modalités des deux expériences précédentes. Les témoins étaient du reste communs aux différentes variables et les fermentations avaient lieu parallèlement, à 25°C, dans deux conditions d'aération.

Une série de flacons recevait, avant le départ de la fermentation, 39,5 mmol par litre d'acide acétique ; les flacons témoins recevaient le même volume d'eau distillée stérile. Nous avons observé que l'addition d'acide acétique en petites quantités accélérait la marche de la fermentation ; des doses plus fortes la retardent. Après l'arrêt de la fermentation, nous avons dosé les produits secondaires dans le liquide après décantation ; les chiffres obtenus sont rassemblés dans le tableau XXIV.

Nous avons évalué ici encore, dans des fermentations parallèles sous barboteur, l'éthanal entraîné par le dégagement du gaz carbonique ; nous en avons trouvé 0,29 mmol par litre, soit une quantité qui ne saurait entrer en ligne de compte.

Nous remarquons que la formation d'alcool est plus élevée dans les fermentations en présence d'acide acétique ; le taux de glycérol, au contraire, y est plus faible. Seuls les produits butanedioliques ont subi

une augmentation. Nous avons rapporté comme précédemment les produits secondaires du témoin au glycérol de la fermentation déviée, afin d'essayer d'exprimer quantitativement le sort de l'acide acétique.

TABLEAU XXIV

Fermentations déviées par addition d'acide acétique

	Aérobiose				Anaérobiose			
	Témoin	Chiffres rapportés au glycérol de la fermentation déviée	+ 39,5 mmol acide acétique	*Différence*	Témoin	Chiffres rapportés au glycérol de la fermentation déviée	+ 39,5 mmol acide acétique	*Différence*
Sucre	2,9		2,8		3,2		5,5	
Alcool	11°8		11°85		11°75		11°95	
Alcool total	11°95		12°0	+ 0°05	11°9		12°25	+ 0°35
Glycérol (*g*)	86,4		64,7	— 21,7	83,6		65,6	— 18,0
Acide acétique (*a*)	13,9	10,4	39,8	+ 29,4	17,0	13,3	40,4	+ 27,1
Acide succinique (*s*)	8,0	6,0	6,4	+ 0,4	4,9	3,8	4,9	+ 1,1
Acétoïne (*m*)	1,8	1,3	2	+ 0,7	1,6	1,3	1,7	+ 0,4
2,3-butanediol (*b*)	4,3	3,2	6,8	+ 3,6	5,5	4,3	6,8	+ 2,5
Éthanal (*h*)	5,6	4,2	4,0	— 0,2	1,4	1,1	1,3	+ 0,2
Σ	81				69			
100 Σ/*g*	94				82			
Acide acétique pratiquement disparu (1)			13,6				16,1	
Acide acétique formé d'après *g*			7,0				8,9	
Acide acétique théorique total			46,5				48,4	
Acide acétique réellement disparu			6,7				8,0	
Acide lactique	6,4		9,6	+ 3,2	8,7		12,2	+ 3,5
Acide citrique	1,4		1,7	+ 0,3	1,3		1,5	+ 0,2

(1) (Acide acétique formé dans le témoin + 39,5) — Acide acétique à la fin de la fermentation.

J. VENTRE (142) avait déjà observé en 1937 que les acides volatils ajoutés au moût diminuent pendant la fermentation en anaérobiose. E. PEYNAUD (105) pensait que l'acide acétique ajouté au départ était réduit en alcool éthylique ; en ajoutant au moût de l'acide propionique ou de l'acide butyrique, cet auteur trouvait à la fin de la fermentation, un taux plus élevé d'alcools supérieurs.

La diminution très nette du glycérol dans notre expérience montre qu'en réalité le phénomène est plus complexe. L'interprétation la plus immédiate semble être une réduction de l'acide acétique en éthanal favorisant la fermentation normale au détriment de la fermentation glycéropyruvique et provoquant la formation de produits secondaires supplémentaires ; l'addition d'acide acétique reviendrait dans ce cas à une addition d'éthanal. On comprendrait ainsi pourquoi de faibles doses d'acide acétique accélèrent la fermentation.

Nous avons essayé de vérifier quantitativement cette hypothèse. Pour cela il était nécessaire de connaître l'acide acétique formé dans la fermentation déviée et l'acide acétique réellement disparu.

Ces calculs ne peuvent être qu'approximatifs ; nous avons calculé l'acide acétique formé en supposant que $\Sigma = 0{,}94\ g$, comme dans le cas du témoin

$$a = \frac{0{,}94\,g - (5\,s + b + 2\,m + h)}{2}.$$

L'acidité volatile théorique totale est la somme de cette valeur et de l'acide acétique ajouté au départ, et l'acidité volatile réellement disparue s'obtient en retranchant de l'acidité volatile théorique totale, l'acide acétique trouvé par dosage.

Mais si l'on essaie à partir des chiffres obtenus de faire le bilan comme dans le cas d'une addition d'éthanal, on s'aperçoit que notre hypothèse ne paraît pas du tout se vérifier, même en anaérobiose. Nous avons donc cherché à préciser et à expliquer cette expérience par deux autres séries d'essais.

b) Évolution de l'éthanal et de l'acide acétique dans des fermentations en présence d'acide acétique

Nous avons dosé l'éthanal et les acides volatils au cours de la fermentation par deux souches de *Saccharomyces ellipsoïdeus*, d'un moût ayant 170 g de sucre par litre. Les fermentations étaient conduites à 25°C, en anaérobiose obtenue par un dispositif à tube effilé. Une série de flacons a servi de témoin et l'autre a reçu avant le départ de la fermentation 64 mmol d'acide acétique par litre.

Les chiffres obtenus permettent de tracer les courbes d'évolution de l'éthanal et de l'acide acétique en fonction du temps (fig. 7).

Les courbes d'acide acétique des fermentations déviées présentent d'abord une légère chute correspondant à une utilisation de l'acide ajouté au départ ; puis la courbe passe par un minimum à peine marqué et se stabilise. L'allure de cette courbe est la résultante de la disparition de l'acide acétique et de sa formation, mais le minimum d'acide acétique ne correspond pas en général au maximum d'éthanal.

La considération de l'évolution de l'éthanal en fonction du temps montre que la courbe de la fermentation en présence d'acide acétique présente un maximum considérablement plus élevé que la courbe du témoin : 136 mg au lieu de 55 pour la levure n° 41, 218 au lieu de 145 pour la levure n° 40. Par contre, la différence des taux d'éthanal en fin de fermentation est faible. La teneur plus grande en éthanal libre a pour conséquence une formation légèrement plus élevée de produits secondaires, comme nous

l'avons déjà vu et une formation plus importante d'alcool. S'il y a davantage d'éthanal libre, cette expérience ne prouve pas qu'il provienne de la réduction de l'acide acétique ajouté. On peut aussi bien penser que l'acide acétique inhibe une ou plusieurs diastases d'utilisation de l'éthanal et provoque ainsi son accumulation.

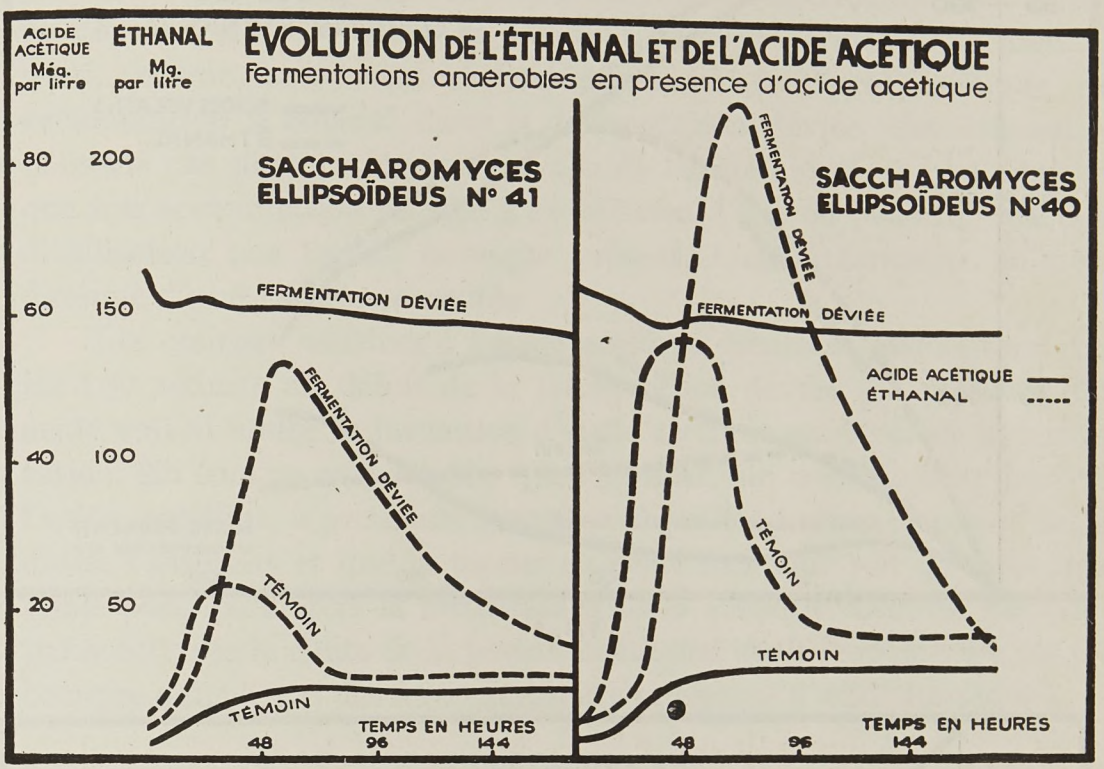


FIG. 7

c) Fermentation en présence d'acide formique

Si l'on répète les deux expériences précédentes en ajoutant de l'acide formique au moût au lieu d'acide acétique, il sera possible de voir par dosage direct si cet acide est réduit en formol ou en méthanol, de suivre la formation d'acide acétique et la disparition de l'acide formique et d'essayer d'en faire un bilan. On pourra par analogie en déduire des conclusions relatives à l'utilisation de l'acide acétique.

Nous avons donc fait fermenter un moût de raisin à 200 g de sucre par litre et de pH 3,36 par deux levures *Saccharomyces ellipsoïdeus*, dans deux conditions d'aération. Nous avions deux séries de flacons dans chacune de ces conditions : l'une servait de témoin et l'autre recevait avant le départ de la fermentation 40 mmol d'acide formique par litre.

Nous avons suivi durant la fermentation les teneurs en éthanal, en acide formique, en acide acétique, en formol et bien entendu en sucre, ce qui nous a permis de tracer les courbes d'évolution des trois premiers de

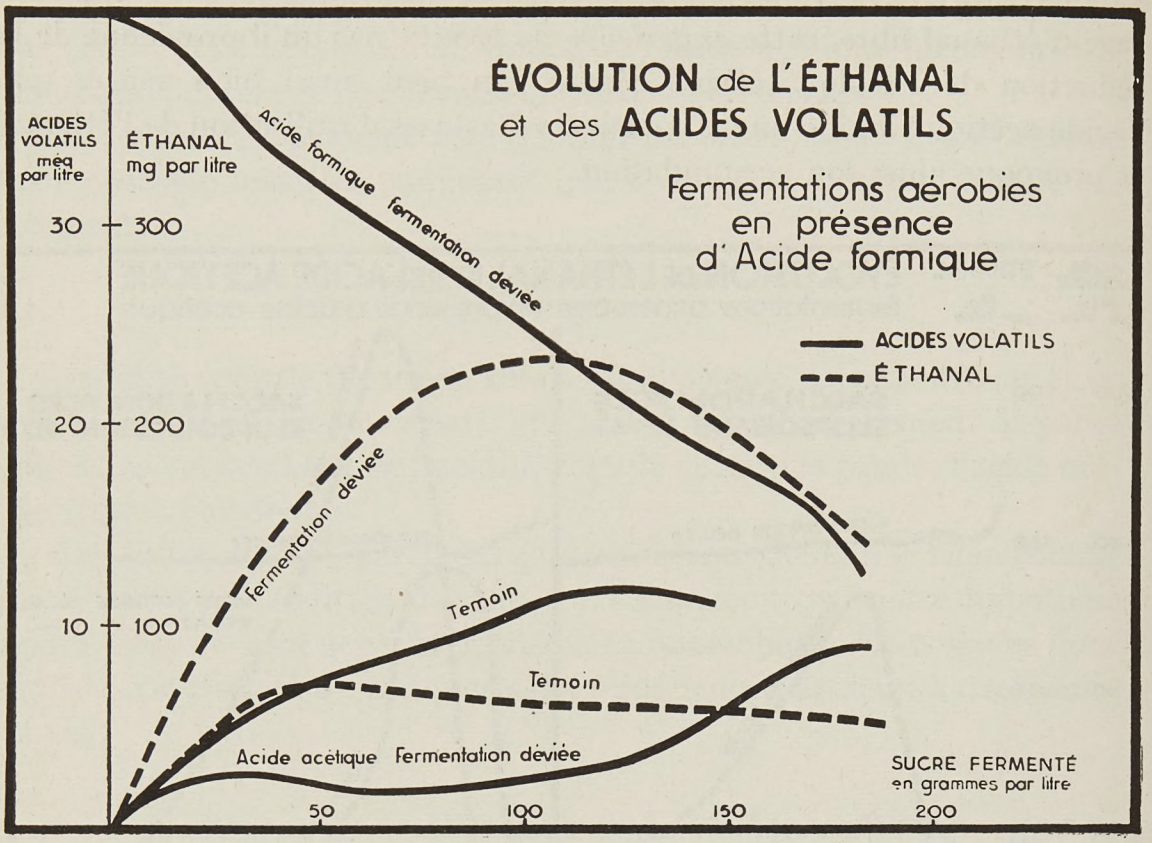

ÉVOLUTION de L'ÉTHANAL
et des ACIDES VOLATILS
Fermentations aérobies
en présence
d'Acide formique
ACIDES VOLATILS
ÉTHANAL
ACIDES VOLATILS méq par litre
ÉTHANAL mg par litre
30
300
20
200
10
100
Acide formique fermentation déviée
Fermentation déviée
Témoin
Témoin
Acide acétique Fermentation déviée
SUCRE FERMENTÉ en grammes par litre
50
100
150
200

FIG. 8

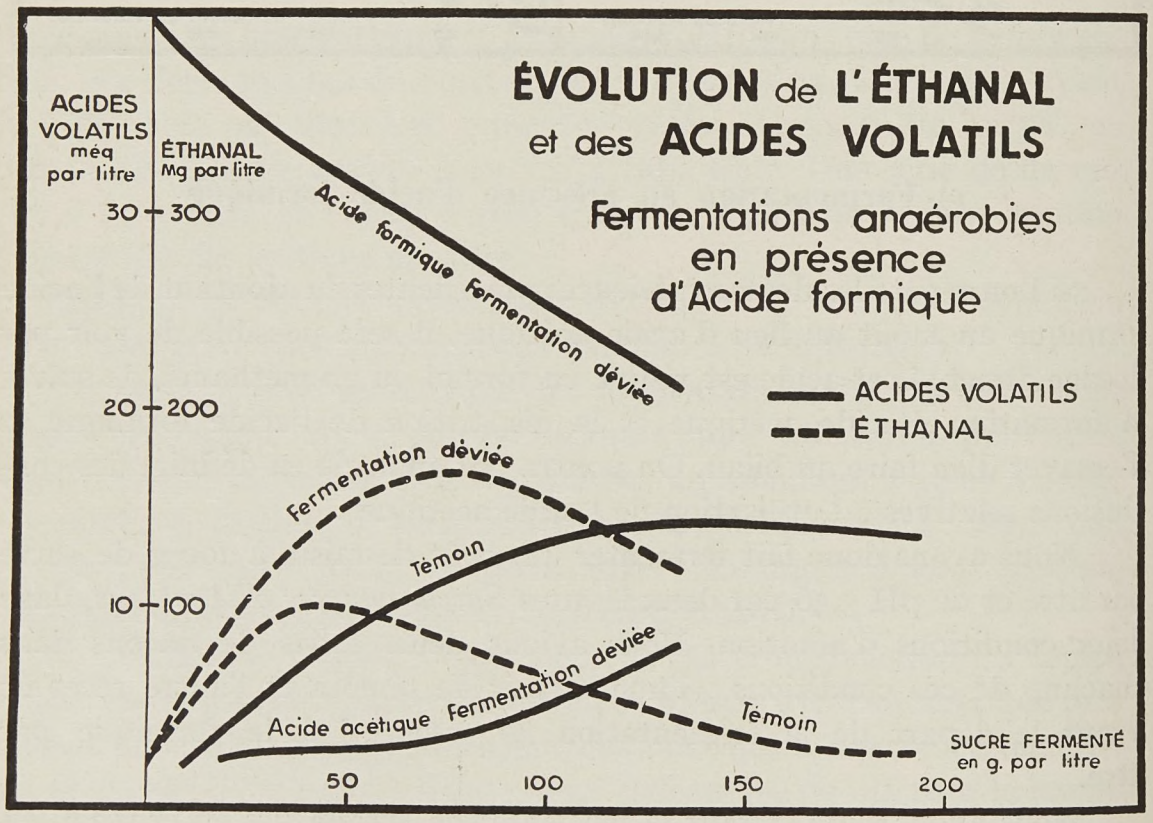

ÉVOLUTION de L'ÉTHANAL
et des ACIDES VOLATILS
Fermentations anaérobies
en présence
d'Acide formique
ACIDES VOLATILS
ÉTHANAL
ACIDES VOLATILS méq par litre
ÉTHANAL Mg par litre
30
300
20
200
10
100
Acide formique Fermentation déviée
Fermentation déviée
Témoin
Acide acétique Fermentation déviée
Témoin
SUCRE FERMENTÉ en g. par litre
50
100
150
200

FIG. 9

ces corps en fonction du sucre fermenté (fig. 8 et 9). A la fin de la fermentation, nous avons dosé dans le liquide séparé du dépôt de levures, les produits secondaires habituels et le méthanol.

Il ne se forme pratiquement pas de formol, à aucun moment de la fermentation ; donc l'acide gras volatil ajouté à une fermentation n'est pas transformé par réduction en l'aldéhyde correspondante. Les courbes de l'évolution de l'éthanal en fonction du sucre fermenté, accusent ici aussi, comme dans le cas où l'acide introduit est l'acide acétique, une accumulation d'éthanal dans la fermentation déviée. Cet éthanal ne pouvant pas provenir de la réduction de l'acide ajouté, il faut admettre que son accumulation est due à l'inhibition d'une ou plusieurs réactions d'utilisation par l'acide formique présent. L'acide formique lui-même diminue d'une manière continue.

Les courbes relatives à l'acide acétique montrent que sa formation est très réduite au début de la fermentation déviée. La présence d'un acide volatil inhibe la formation d'acide acétique au début de la fermentation. En somme on peut dire que l'éthanal, qui normalement donne de l'acide acétique, s'accumule jusqu'à ce que les autres réactions secondaires l'utilisent et que la teneur en acide formique soit devenue assez faible pour permettre la formation d'acide acétique. Ceci est corroboré par le fait que la chute de la teneur en éthanal après le maximum est plus brusque dans le cas des fermentations en présence d'acide formique.

TABLEAU XXV

Produits secondaires de fermentations en présence d'acide formique
Saccharomyces ellipsoïdeus n° 81

Les chiffres sont des mmol par litre, sauf le sucre et l'alcool

	Aérobiose		Anaérobiose	
	Témoin	+ 40 mmol H COOH	Témoin	+ 40 mmol H COOH
Sucre	2,0	95	10,2	108
Alcool éthylique	10°9	6°4	11°3	6°3
Alcool éthylique total	11°0	11°7	11°9	12°3
Alcool méthylique (mmol)	1,0	2,0	0,6	2,8
Glycérol (*g*)	*109*	*46*	*71*	*30*
Acide acétique (*a*)	8,0	7	9,2	5,5
Acide formique	—	31,7	—	36,7
Éthanal (*h*)	1,2	3,3	1,4	3,0
Acide succinique (*s*)	9,4	4,3	5,8	3,5
Acétoïne (*m*)	0,3	3,5	0,5	1,9
2,3-butanediol (*b*)	6,5	8,2	7,9	6,1
Σ	*71*	*54*	*58*	*40*
100 Σ/*g*	65	117	82	133
Formol	1,3	2,4	0,6	0
Acide lactique	3,6	2,3	3,6	3,4
Acide citrique	0,9	0,9	1,0	0,9

Les tableaux XXV et XXVI exposent les teneurs des produits secondaires en fin de fermentation.

TABLEAU XXVI

Produits secondaires de fermentations en présence d'acide formique
Saccharomyces ellipsoïdeus n° 41

Les chiffres sont des mmol, sauf le sucre et l'alcool

	Aérobiose		Anaérobiose	
	Témoin	+ 40 mmol H COOH	Témoin	+ 40 mmol H COOH
Sucre	1,7	17	6,4	66
Alcool éthylique	10°7	9°8	11°7	8°o
Alcool éthylique total	10°8	10°8	12°o	11°7
Alcool méthylique (mmol)	1,5	2,1	1,7	3,6
Glycérol (*g*)	*102*	*74*	*74*	*54*
Acide acétique (*a*)	10,6	8,7	13,7	8,2
Acide formique	—	12,7	—	21,2
Éthanal (*h*)	2,9	3,1	1,1	2,7
Acide succinique (*s*)	8,1	5,6	5,1	2,4
Acétoïne (*m*)	0,6	8,1	0,6	6,0
2,3-butanediol (*b*)	6,1	16	7,4	9,7
Σ	*72*	*81*	*63*	*53*
100 Σ/*g*	70	109	85	97
Formol	1,5	0,6	0,5	0,9
Acide lactique	3,2	3,6	2,4	2,8
Acide citrique	1,0	1,0	1,0	0,8

Nous constatons une diminution du glycérol, de l'acide succinique et de l'acide acétique et au contraire une augmentation en général assez considérable des produits butanedioliques. La production d'alcool éthylique augmente et il se forme aussi un peu plus d'alcool méthylique. Nous retrouvons donc dans les grandes lignes, les mêmes résultats que dans l'expérience d'addition d'acide acétique.

d) **Discussion**

Plusieurs résultats importants ressortent des expériences précédentes.

1. — L'addition d'acide acétique provoque une diminution de l'acide succinique ; si on tient compte de ce que la formation de tous les produits secondaires est réduite par suite de la diminution du taux de fermentation glycéropyruvique et considère le chiffre du témoin rapporté au glycérol de la fermentation déviée, on constate qu'il y a dans cette dernière un peu plus d'acide succinique ; ce résultat, que nous avons retrouvé dans d'autres expériences de fermentation en présence d'acide acétique, n'est pas assez net pour fournir une preuve à l'hypothèse qui

explique la formation anaérobie d'acide succinique par une déshydrogénation de deux molécules d'acide acétique :

$$2CH_3\ COOH \xrightarrow{2H} COOH\ CH_2\ CH_2\ COOH$$

(Cependant cette hypothèse recevra plus loin une confirmation dans les expériences de fermentation en présence d'acétate marqué).

2. — Le glycérol subit une diminution très nette, 20 à 30 p. 100. Il y a donc diminution du taux de la fermentation glycéropyruvique. Ceci peut s'expliquer par l'accumulation d'éthanal en présence d'un acide volatil ; la phase d'induction est écourtée et le cycle de Gay-Lussac est activé aux dépens de la fermentation glycéropyruvique.

3. — Par suite de la diminution du taux de fermentation glycéropyruvique, il doit y avoir moins de produits secondaires dans la fermentation déviée. Ceci est exact pour l'acide succinique et l'acide acétique, mais les produits butanedioliques, au contraire, sont augmentés, surtout en présence d'acide formique. Le taux de ces produits est d'autant plus élevé qu'il y a davantage d'acide formique utilisé.

4. — La teneur en acide acétique est restée à peu près stationnaire dans les fermentations en présence d'acide acétique. En présence d'acide formique on peut suivre la marche de sa formation ; on constate en gros qu'elle est freinée pendant un certain temps, en général pendant la fermentation de 35 à 100 g de sucre, puis elle repart. Cette période de freinage semble correspondre à l'accumulation d'éthanal. On peut penser qu'il y a entre les deux phénomènes une relation de cause à effet et que la formation moindre d'acide acétique est responsable de l'accumulation d'éthanal.

5. — Le taux d'acide formique diminue d'une façon d'ailleurs très variable avec la souche de levure. Or, il ne donne pas de formol et très peu de méthanol. La disparition de 20 à 25 mmol d'acide formique ne donne que 1 à 2 mmol supplémentaires de méthanol. Il faut donc penser qu'il est transformé en produits secondaires, plus précisément en produits butanedioliques, dont nous avons vu que la formation est très augmentée. Le bilan des produits secondaires montre d'ailleurs que Σ est plus élevé en présence d'acide formique et que Σ/g est souvent plus grand que 1, ce qui est une preuve directe de l'utilisation de l'acide formique pour la formation de certains produits secondaires.

6. — La formation d'acide lactique est légèrement plus élevée surtout en présence d'acide acétique. On peut expliquer ce fait de la même façon que dans le cas des fermentations en présence d'éthanal.

7. — Les expériences de fermentation en présence d'acide formique ne montrent pas que l'acide citrique se forme à partir de cet acide, comme le pense Gobis (38). Nous avons vu qu'il dérive du sucre et même plus précisément de l'acide pyruvique et de l'éthanal.

Nous essaierons d'interpréter ces résultats très importants.

Cas d'une addition d'acide acétique. La réaction qui dans une fermentation ordinaire forme l'acide acétique est une dismutation :

$$2CH_3\,CHO + H_2O \rightleftarrows CH_3\,COOH + CH_3\,CH_2\,OH$$

Elle est catalysée par l'aldéhydomutase. L'éthanal se formant constamment au cours de la fermentation normale, l'équilibre est sans cesse rompu et la réaction donne de l'acide acétique. Mais la présence d'un gros excès d'acide acétique empêche cette formation par le mécanisme inverse. Dans ces conditions, il ne se formerait pas d'acide acétique ou très peu et l'éthanal habituellement dismuté s'accumulerait au début. Puis l'éthanal est utilisé et nous constatons qu'il se forme surtout davantage de produits butanedioliques que dans la fermentation normale. L'acide acétique semble être une sorte de catalyseur de leur formation. Nous interprétons ces faits dans le chapitre VII. Nous pensons qu'il est possible qu'aient lieu les réactions suivantes : condensation d'une molécule d'acide acétique avec une molécule d'éthanal pour donner du diacétyle ; cette réaction serait catalysée par le système carboxylasique ; elle serait suivie d'une oxydoréduction entre le diacétyle et l'éthanal qui conduit à l'acétoïne, tandis que l'acide acétique est régénéré.

La teneur en alcool, légèrement plus forte en présence d'acide acétique, est la résultante de l'augmentation du taux de la fermentation normale au détriment de la fermentation glycéropyruvique et de l'utilisation de l'éthanal par le mécanisme précédent. L'acide acétique subit quelquefois une légère diminution, une faible partie est peut-être réduite en alcool comme nous l'avons vu pour l'acide formique et comme l'indiquait E. PEYNAUD.

Cas d'une addition d'acide formique. L'action de l'acide formique est plus difficile à interpréter. Il semble que l'acide formique soit lui aussi à l'origine d'une partie des produits butanedioliques. D'autre part la faible teneur en glycérol dans le milieu fermenté par *Saccharomyces ellipsoïdeus* n° 81 en présence d'acide formique, alors qu'une très faible quantité de cet acide seulement a été utilisée, peut être due à l'accumulation dans ce cas d'un corps hydrogéné autre que le glycérol et encore inconnu.

L'addition d'acide formique produit, nous l'avons vu, une accumulation d'éthanal qui semble correspondre à un ralentissement de la formation d'acide acétique. On peut penser que la présence d'acide formique gêne, sans l'inhiber complètement, la formation d'acide acétique qui repart lorsque la concentration en acide formique a suffisamment baissé.

La teneur en alcool, généralement un peu plus élevée en présence d'acide formique, est ici aussi la résultante de la diminution de la fermentation glycéropyruvique et de l'utilisation de l'éthanal.

Donc dans les deux cas, l'éthanal formé par la fermentation s'accu-

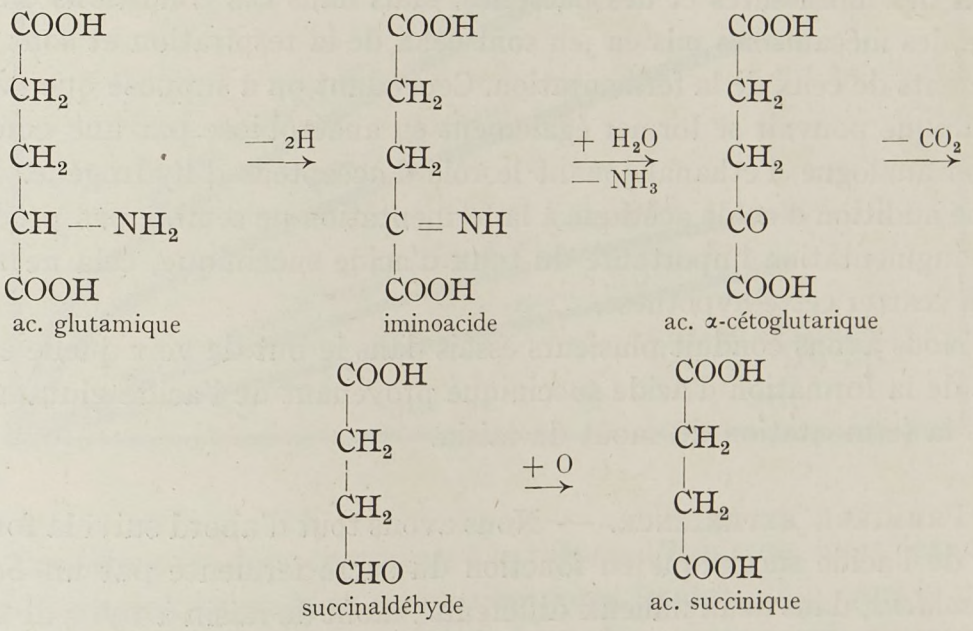
mule au début par suite de l'inhibition plus ou moins complète de la réaction de formation de l'acide acétique, qui précisément est maximum dans les premiers temps de la fermentation. Cet éthanal est utilisé par deux mécanismes : la fermentation normale, le taux de fermentation glycéropyruvique est ainsi diminué ; et la condensation avec l'acide volatil introduit, qui aboutit finalement à la formation d'acétoïne, puis de 2,3-butanediol par réduction.

Chapitre VI

ÉTUDE DE LA FORMATION DE L'ACIDE SUCCINIQUE

Pasteur a montré le premier la présence d'acide succinique parmi les produits de la dégradation du sucre. Schutzenberger et Destrem (126), Boussingault (12), Claudon et Morin (19), et d'autres auteurs (55), l'ont également signalé et ont admis, comme Pasteur, que cet acide dérive du sucre. Mais Ehrlich en 1909 (25), ajoutant de l'acide glutamique à la levure en fermentation, montra que cet acide aminé est transformé en grande partie en acide succinique ; cet auteur en a déduit que tout l'acide succinique de la fermentation provient de l'acide glutamique de la levure par le mécanisme suivant :

L'aminoacide est d'abord transformé en iminoacide ; celui-ci subit une désamination par hydratation en donnant naissance à l'acide α cétonique correspondant, qui est ici l'acide α cétoglutarique. Ce dernier est décarboxylé en succinaldéhyde qui conduit à l'acide succinique :



Cette théorie a été largement adoptée et est restée classique pour de nombreux auteurs (41). Récemment L. Federico (27) a repris cette hypothèse ; pour cet auteur la formation d'acide succinique est en rapport avec

le métabolisme des aminoacides et ne provient pas du sucre ; elle peut se faire même par transamination à partir du glycocolle, par exemple. De petites quantités pourraient également provenir des acides malique et tartrique qui existent dans beaucoup de milieux naturels.

Cependant les expériences de E. PEYNAUD à la suite de l'hypothèse de L. GENEVOIS, ainsi que les expériences que nous avons faites et qui sont exposées dans le chapitre des fermentations déviées, ont démontré avec quelque certitude que de l'acide succinique se forme à partir de l'éthanal ou de l'acide pyruvique, donc dérive de la molécule de sucre. KLEINZELLER en 1951 (57) est arrivé à la même conclusion. Un autre argument important en faveur de cette hypothèse réside dans le fait que la production d'acide succinique dépasse souvent le poids des levures formées ; on ne peut donc dans ce cas invoquer l'acide glutamique des levures comme seule source d'acide succinique, et il faut envisager la production d'acide succinique à partir du sucre.

Mais le mécanisme exact de cette formation n'est pas élucidé. En aérobiose, la condensation oxydative de l'acétate en succinate :

$$2CH_3\,COOH \xrightarrow{O} COOH\,CH_2\,CH_2\,COOH + H_2O$$

a été postulée par THUNBERG (136). Les travaux de SONDERHOFF (146), avec de la levure appauvrie placée dans une solution acide acétique-acétate et fortement aérée, ont montré qu'il se forme dans ces conditions de l'acide succinique ou de l'acide citrique, alors que l'acide acétique disparaît. Cette réaction avait été également adoptée par BERNHAUER (10) dans le cas des moisissures et des bactéries. Mais dans ces conditions d'aérobiose, les mécanismes mis en jeu sont ceux de la respiration et sont bien différents de ceux de la fermentation. Cependant on a supposé que l'acide succinique pouvait se former également en anaérobiose par une condensation analogue, l'éthanal jouant le rôle d'accepteur d'hydrogène. Mais si une addition d'acide acétique à la fermentation ne semble pas produire une augmentation importante du taux d'acide succinique, cela ne suffit pas à écarter cette hypothèse.

Nous avons conduit plusieurs essais dans le but de voir quelle est la part de la formation d'acide succinique provenant de l'acide glutamique dans la fermentation du moût de raisin.

PREMIÈRE EXPÉRIENCE. — Nous avons tout d'abord suivi la formation de l'acide succinique en fonction du sucre fermenté par un *Sacch. ellipsoïdeus*, dans deux milieux différents : moût de raisin à 196 g de sucre par litre et milieu synthétique complet, de composition assez voisine des milieux décrits page 66 et ayant 210 g de saccharose par litre. L'expérience comportait deux flacons de chaque milieu, l'un servait de témoin et

l'autre recevait avant le départ de la fermentation une addition de 2 g par litre d'acide glutamique.

Les résultats obtenus sont illustrés par la figure 10.

La teneur en acide succinique augmente régulièrement avec la quantité de sucre fermenté, d'une manière presque proportionnelle. Cependant, la formation est un peu plus forte pour les tout premiers grammes fermentés. Les courbes n'épousent pas les variations des teneurs en éthanal ou en acide acétique et ne représentent pas l'allure de la fermentation glycéropyruvique. Elles n'ont aucun rapport avec la multiplication des levures.

La présence de 2 g supplémentaires d'acide glutamique augmente la formation de l'acide succinique, tout au long de la courbe. Finalement l'augmentation est de 43 p. 100 pour le moût de raisin, de 30 p. 100 pour le milieu synthétique. Or ce moût contenait 123 mg par litre d'azote ammoniacal, alors que le milieu synthétique en contenait 425 ; il est vraisemblable que les deux faits sont liés, la levure utilisant d'autant plus d'acide glutamique qu'elle a moins d'azote ammoniacal à sa disposition.

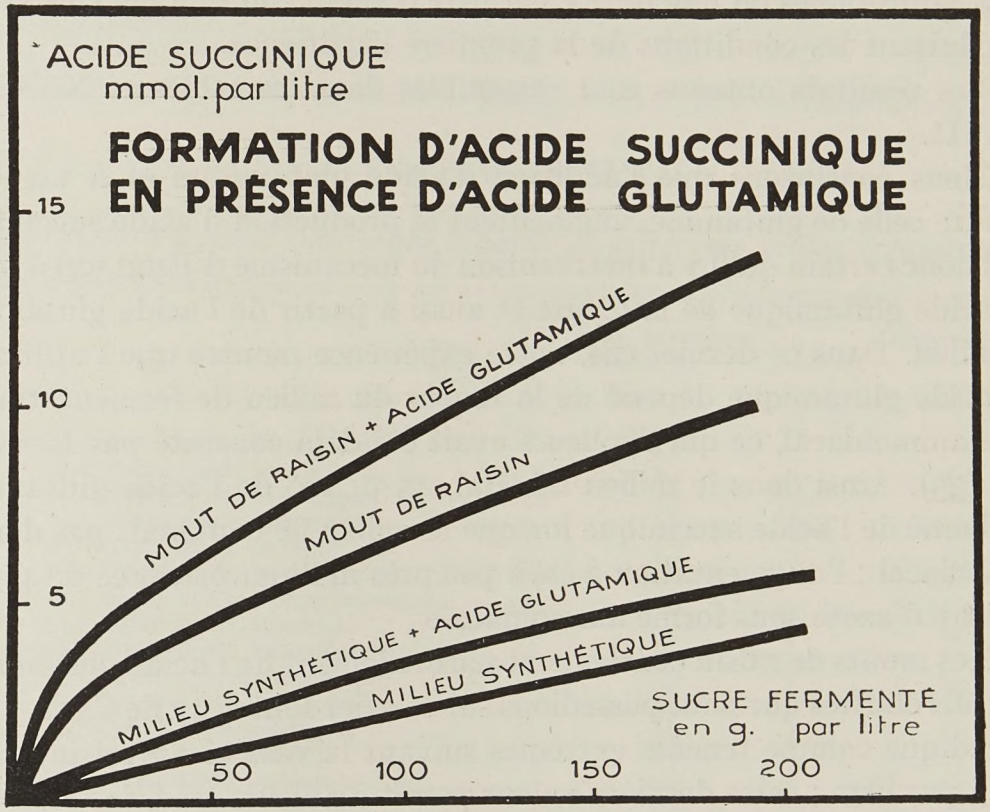


FIG. 10

Ces faits sont donc conformes à la théorie d'EHRLICH, mais l'existence d'acide succinique en forte proportion après fermentation dans le milieu synthétique témoin pourtant absolument dépourvu d'acide glutamique, appuie notre précédente affirmation d'une autre origine de ce composé, beaucoup plus importante : le sucre.

Deuxième expérience. — Dans le but de préciser les intermédiaires possibles entre l'éthanal ou l'acide pyruvique et l'acide succinique, l'expérience suivante a été effectuée. Nous avons fait fermenter en anaérobiose par un *Sacch. ellipsoïdeus* un milieu synthétique contenant des cendres de levure comme matières minérales, 150 g par litre de saccharose et les facteurs de croissance nécessaires aux taux déjà indiqués. Le milieu était ajusté à pH 6. Il était additionné de sulfate d'ammonium comme source d'azote ou d'un acide aminé dont on voulait voir la répercussion sur le taux d'acide succinique, à la dose de 2 g par litre. De même, pour étudier l'influence des divers acides organiques, le même milieu contenant du sulfate d'ammonium était additionné d'un acide organique à la dose de 5 g par litre. (A ce sujet, nous avons observé que la présence des acides α cétoglutarique, pyruvique et surtout oxalacétique retardait légèrement le départ de la fermentation.)

Après fermentation complète, nous avons dosé l'acide succinique et le sucre restant. Les mêmes dosages ont été effectués après la fermentation d'un moût de raisin à 210 g de sucre par litre et d'un muté désulfité à 250 g, additionnés ou non de 2 g par litre d'acide glutamique, c'est-à-dire reproduisant les conditions de la première expérience.

Les résultats obtenus sont rassemblés dans les tableaux XXVII et XXVIII.

Nous constatons que l'addition d'acide glutamique et à un degré moindre celle de glutamine, augmentent la production d'acide succinique. Il est donc certain qu'il y a intervention du mécanisme d'Ehrlich à partir de l'acide glutamique de la levure et aussi à partir de l'acide glutamique du milieu. Dans ce dernier cas, notre expérience montre que l'utilisation de l'acide glutamique dépend de la teneur du milieu de fermentation en azote ammoniacal, ce qui d'ailleurs avait été déjà constaté par L. Genevois (35). Ainsi dans le milieu minéral, 45 p. 100 de l'acide glutamique ont donné de l'acide succinique lorsque le milieu ne contenait pas d'azote ammoniacal ; l'augmentation a été à peu près nulle en présence de 425 mg par litre d'azote sous forme ammoniacale.

Les moûts de raisin contiennent naturellement de l'acide glutamique. Les seuls chiffres que nous possédions sur ce sujet sont ceux de Castor (17) qui indique comme teneurs extrêmes suivant la variété du raisin, 0,26 à 1,06 g par litre ; cette dernière valeur paraît d'ailleurs très élevée. Si l'on considère l'augmentation produite par 2 g par litre d'acide glutamique, dans le cas où elle est la plus forte : 3,5 mmol d'acide succinique supplémentaires pour 13,6 mmol d'acide glutamique ajoutées, donc une utilisation de 26 p. 100, on calcule que l'acide succinique formé à partir d'acide glutamique dans la fermentation d'un moût de raisin peut être de 0,4 à 1,8 mmol par litre.

Une autre observation laisse supposer également que le taux d'acide

succinique provenant de la réaction d'EHRLICH est faible : lorsqu'on ajoute de l'azote ammoniacal à un moût, le taux d'acide succinique formé n'est pas modifié.

TABLEAU XXVII

Formation d'acide succinique à partir d'acide glutamique et de différents acides aminés

	Acide succinique mmol	Différence
Milieu synthétique + 2 g sulfate NH_4	4,6	
— + 13,6 mmol acide glutamique	10,7	+ 6,1
— + 2 g sulfate NH_4 + 13,6 mmol acide glutamique	4,1	— 0,5
— + 13,7 mmol glutamine	7,1	+ 2,5
— + 13,3 mmol asparagine	5,2	+ 0,6
— + 15,0 mmol acide aspartique	4,7	+ 0,1
— + 22,5 mmol alanine	4,7	+ 0,1
— + 19,0 mmol sérine	4,5	— 0,1
Moût 210 g de sucre	5,2	
— + 13,6 mmol acide glutamique	8,7	+ 3,5
Moût 250 g de sucre	4,3	
— + 13,6 mmol acide glutamique	5,1	+ 0,8

TABLEAU XXVIII

Formation d'acide succinique à partir de différents acides organiques

	Acide succinique mmol	Différence
Milieu synthétique sans acide organique	4,6	
— + 37,5 mmol acide l-malique	4,4	— 0,2
— + 37,5 mmol acide dl-malique	4,6	
— + 33,3 mmol acide tartrique	3,2	— 1,4
— + 26,0 mmol acide citrique	3,6	— 1,0
— + 26,0 mmol acide isocitrique	4,8	+ 0,2
— + 34,2 mmol acide α-cétoglutarique	20,0	+ 15,4
— + 38,7 mmol acide aconitique	3,7	— 0,9
— + 43,0 mmol acide fumarique	6,5	+ 1,9
— + 37,9 mmol acide oxalacétique	7,5	+ 2,9
— + 56,8 mmol acide pyruvique	4,8	+ 0,2
— + 65,7 mmol acide glycolique	3,6	— 1,0
— + 55,4 mmol acide lactique	3,9	— 0,7
— + 48,0 mmol acide malonique	4,4	— 0,2
— + 41,6 mmol acide tartronique	3,2	— 1,4
— + 33,8 mmol acide citramalique	3,9	— 0,7

Cette formation, aussi faible soit-elle, donne lieu à une certaine erreur dans les bilans où le chiffre d'acide succinique intervient avec le coefficient 5. Mais cette erreur peut être chiffrée au maximum à $1{,}8 \times 5 = 9$, c'est-à-dire environ 10 p. 100 des valeurs de Σ habituellement rencontrées. C'est l'ordre de grandeur de la marge d'erreur.

Ce calcul montre encore que la majeure partie de l'acide succinique vient du sucre fermenté, la production d'acide succinique dépassant toujours ce chiffre.

L'expérience précédente qui met en jeu un grand nombre d'acides organiques, montre que trois d'entre eux sont susceptibles de fournir un supplément d'acide succinique au cours de la fermentation ; ce sont les acides α cétoglutarique, fumarique et oxalacétique. Les acides malique et tartrique, contrairement à certains résultats (27), n'ont pas donné naissance à de l'acide succinique.

L'acide α cétoglutarique $COOH — CH_2 — CH_2 — CO — COOH$ est celui qui donne la plus forte augmentation : 45 p. 100 de la quantité ajoutée sont transformés en acide succinique. Cet acide se transforme en acide succinique par simple décarboxylation oxydative et on admet précisément qu'il est un intermédiaire dans le passage de l'acide glutamique à l'acide succinique par le mécanisme d'Ehrlich. Il est donc logique que son addition augmente le taux d'acide succinique, sans que ce fait du reste impose son intervention dans la formation d'acide succinique par fermentation du sucre. Remarquons que le pourcentage de transformation est ici le même que dans le cas d'une addition d'acide glutamique dans un milieu sans azote ammoniacal.

Les additions d'acide fumarique et d'acide oxalacétique augmentent également le taux d'acide succinique. Nous avons vu dans un chapitre précédent que l'addition d'éthanal ou d'acide pyruvique augmentait aussi la teneur en acide succinique, mais l'effet de l'acide oxalacétique est nettement plus important. Cette observation constituerait un argument en faveur de l'opinion des auteurs, tels A. Kleinzeller (57) qui pensent que l'acide succinique dérive de l'acide pyruvique par carboxylation en acide oxalacétique, puis réduction ; la carboxylation du pyruvate serait une réaction limitante.

La réaction : $CH_3CO\ COOH + CO_2 \rightarrow COOH\ CH_2\ CO\ COOH$ est connue sous le nom de réaction de Wood et Werkman. Ces auteurs, opérant sur des préparations brutes de *M. lysodeikticus* (61) et de foie de pigeon (139) avec du gaz carbonique marqué ($^{13}CO_2$), ont retrouvé le carbone lourd dans le groupement β carboxyle de l'oxalacétate. Kalnitsky et Werkman (52) ont trouvé que des extraits d'*E. coli* incubés avec du gaz carbonique et du pyruvate formaient de l'oxalacétate ou un composé très voisin. Néanmoins, des essais avec des extraits purifiés d'autres microorganismes (112) ou de foie de pigeon (140) capables de décarboxyler l'oxalacétate, ont été négatifs et la réversibilité de la réaction de décarboxylation de l'oxalacétate n'est pas directement prouvée.

Il n'est donc pas certain qu'une telle réaction de carboxylation soit possible chez la levure. D'autre part, si le rattachement de la formation

de l'acide succinique aux réactions du cycle de KREBS, dans la fermentation anaérobie du sucre, est une hypothèse séduisante, il n'est nullement démontré qu'elle soit valable, même dans le cas où l'on envisage l'oxydation respiratoire des glucides (62) ; à plus forte raison dans des conditions d'anaérobiose.

TROISIÈME EXPÉRIENCE. — Afin de déterminer si l'acide acétique intervient dans la formation de l'acide succinique, nous avons fait fermenter, en anaérobiose par un *Saccharomyces ellipsoïdeus*, un milieu synthétique de composition habituelle, ajusté à pH 3,5 et 172 grammes de saccharose par litre, en présence de 40 milligrammes par litre d'acétate de sodium marqué d'un carbone radioactif sur le groupement méthyle, $^{14}CH_3$ COO Na. Cette quantité correspondait à une activité β de 420 000 coups par minute, mesurée au compteur de GEIGER.

A la fin de la fermentation nous avons isolé d'une part l'acide acétique sous forme d'acétate de potassium et d'autre part l'acide succinique. Nous avons étudié ces deux corps au compteur de GEIGER et constaté que tous les deux sont actifs ; les chiffres obtenus sont : acétate de potassium : 138 500 coups/minute, acide succinique : 107 150 coups/minute.

L'acide succinique contient du carbone radioactif provenant de l'acétate, en quantité assez importante puisqu'on y retrouve le quart de l'activité initiale de l'acétate ; donc l'acide acétique ajouté intervient dans la formation de l'acide succinique. Ce résultat apporte un argument de poids à l'hypothèse de L. GENEVOIS (32) qui explique la formation normale de l'acide succinique au cours de la fermentation anaérobie du sucre par déshydrogénation et condensation de deux molécules d'acide acétique venant de la réaction de CANNIZZARO en présence d'une molécule d'éthanal qui sert d'accepteur d'hydrogène :

$$2CH_3COOH + CH_3CHO \rightarrow COOHCH_2CH_2COOH + CH_3CH_2OH$$

Il est possible que cette condensation passe par l'intermédiaire du radical cétène $CH^2 — CO$ suivant l'hypothèse de MARTIUS. On pourrait alors écrire par analogie avec ce qui a été admis en aérobiose par certains auteurs :

$$2CH_3COOH \rightarrow 2CH_2 — CO + 2H_2O$$

$$2CH_2 — CO + CH_3CHO \rightarrow COCHCHCO + CH_3CH_2OH$$

$$COCHCHCO + 2H_2O \rightarrow COOHCH_2CH_2COOH$$

Somme :

$$2\,CH_3\,COOH + CH_3\,CHO \rightarrow COOH\,CH_2\,CH_2\,COOH + CH_3\,CH_2OH.$$

La réaction globale est la même et le coefficient de l'acide succinique dans l'équation des produits secondaires reste 5, chiffre qui cadre bien au point de vue quantitatif avec les résultats expérimentaux.

CONCLUSIONS

Nous avons montré dans ce chapitre, d'une manière certaine, que la plus grande partie de l'acide succinique d'une fermentation anaérobie dérive du sucre par l'intermédiaire de l'acide pyruvique et de l'éthanal. La formation à partir de l'acide glutamique selon le schéma d'EHRLICH n'est pas exclue, mais elle demeure toujours très faible.

A la suite de nos expériences, le mécanisme de la formation à partir du sucre est moins obscur. La carboxylation du pyruvate en oxalacétate et le passage de l'acide succinique suivant les étapes malique et fumarique du cycle de KREBS, indiqués par certains auteurs, ne constituent pour le moment qu'une hypothèse non démontrée. Par contre, nous avons pu montrer, grâce à l'emploi d'acétate radioactif, que l'acide acétique intervient dans la formation de l'acide succinique, confirmant ainsi l'hypothèse d'une condensation dismutation qui met en œuvre 5 molécules d'éthanal pour une d'acide succinique.

CHAPITRE VII

ÉTUDE DE LA FORMATION DE L'ACÉTOINE ET DU 2,3-BUTANEDIOL

La formation d'un glycol au cours de la fermentation alcoolique est connue depuis les travaux de HENNINGER (1882-1888), déjà cités dans l'Introduction. L'acétoïne fut signalée dans les vins dès 1907, mais NEUBERG et ses collaborateurs furent les premiers à démontrer, en 1923, le rôle de l'éthanal dans sa formation. Ils observèrent (87) que si l'on ajoute de la benzaldéhyde à une fermentation, on obtient de l'acétylphénylcarbinol :

$$CH_3\,CHO + C_6H_5\,CHO \rightarrow CH_3 — CO — CHOH — C_6H_5.$$

De même si l'on ajoute de l'éthanal, il se forme de l'acétoïne :

$$2CH_3\,CHO \rightarrow CH_3 — CHOH — CO — CH_3.$$

L'acide pyruvique est décarboxylé avant la réaction de formation de l'acétoïne. L'acétoïne se forme donc par condensation d'une molécule d'éthanal produit intermédiairement avec une molécule d'éthanal ajouté sous l'action d'un enzyme que NEUBERG nomma la « carboligase » (90). Le même mécanisme explique la formation d'une autre acyloïne (ou cétone alcool-α), quand on ajoute à la fermentation l'aldéhyde corres-

pondante. Le 2,3-butanediol est formé par réduction de l'acétoïne. NEUBERG pensait d'ailleurs qu'il n'apparaît pas normalement d'acétoïne au cours de la fermentation du sucre.

KLUYVER et ses collaborateurs (58) ont donné des résultats qualitatifs obtenus en utilisant la réaction de LEMOIGNE. Ils ont expliqué l'absence d'acétoïne dans une fermentation normale par la disparition rapide de l'éthanal par réduction ; ils ont montré que l'addition d'un accepteur d'hydrogène modifie la formation de ces produits. Ces auteurs pensaient qu'il se forme uniquement du butanediol en anaérobiose et uniquement de l'acétoïne en aérobiose.

Deux problèmes sont donc posés par la présence d'acétoïne et de 2,3-butanediol dans les milieux de fermentation : celui de l'existence d'un enzyme spécifique, la « carboligase », telle que la concevait NEUBERG, pour expliquer le mécanisme de formation de l'acétoïne par la levure, et celui de la coexistence dans les milieux fermentés du carbinol et du glycol, avec possibilité d'un équilibre d'oxydoréduction entre les deux corps. Il sera discuté dans ce chapitre de ces deux problèmes.

I. — MÉCANISME DE LA FORMATION DE L'ACÉTOINE

A partir de 1930, DIRSCHERL et son école (22) ont essayé de démontrer dans une série de travaux que la carboligase n'existe pas et que la formation de l'acétoïne est due à la condensation non enzymatique d'une molécule d'éthanal ajoutée ou présente dans le milieu avec une molécule d'éthanal « naissant », provenant de l'acide pyruvique. En effet, la levure ne forme pas d'acétoïne à partir d'éthanal seul, sans acide pyruvique. D'après cet auteur la condensation acyloïnique s'effectue par voie purement chimique et la présence d'aldéhyde active ou « naissante » est nécessaire. C'est également l'opinion de LANGENBECK (69).

Cette hypothèse a été renforcée par le fait que toutes les tentatives pour démontrer avec certitude l'existence d'une carboligase distincte de la carboxylase et pour l'isoler, ont échoué. Cependant certains auteurs, STEPANOV et KUSIN (133), HOFMANN (45) et TOMIYASU (137) par exemple, restaient convaincus de l'existence d'un tel enzyme.

Les études isotopiques de GROSS et WERKMAN (40) avec de l'éthanal deux fois marqué ($^{13}CH_3$ ^{13}CHO) ajouté à une fermentation, ont montré que l'acétoïne formée par la levure à partir de cet éthanal et d'acide pyruvique non marqué était étiquetée sur ses quatre carbones. Cette observation semblerait indiquer la formation d'un intermédiaire symétrique. On a montré par l'étude de certaines bactéries telles que *Staphylococcus aureus* (144) *Aerobacter aerogenes* (50) *Bacillus subtilis* (77) par exemple, la synthèse acétoïnique chez ces organismes passe par le terme acide α que

acétolactique. Dans le cas de la levure, l'étude de l'oxydation par l'acide periodique de l'acétoïne marquée obtenue montre que l'extrémité carbinol de la molécule a une activité beaucoup plus grande que l'extrémité carbonyle (51). L'auteur en conclut que pour la levure, il n'y a pas passage par l'acide α acétolactique comme intermédiaire ; en effet si cet acide était mis en jeu, ce serait l'acide acétique formé par l'oxydation periodique de l'extrémité carbonyle de l'acétoïne qui contiendrait la plus grande part d'isotope.

D'autres arguments infirment la formation intermédiaire d'acide α acétolactique. OCHOA (93) cite en plus de l'observation précédente les raisons suivantes : 1° le système demande les ions Mg^{++} ou Mn^{++} et la diphosphothiamine ; ce dernier point ne s'explique pas si l'on admet la condensation en acide α acétolactique suivie d'une décarboxylation :

$$CH_3CO\,COOH + CH_3CHO \rightarrow CH_3-\underset{\substack{|\\ CO\\ |\\ CH_3}}{\overset{\substack{OH\\ |}}{C}}-COOH \rightarrow CH_3CHOH\,COCH_3 + CO_2$$

2° NEUBERG avait trouvé que l'acyloïne formée par la levure à partir d'acide pyruvique et de benzaldéhyde est l'acétylphénylcarbinol. BERG et WESTERFELD (11) ont obtenu l'acétoïne ou acétylméthylcarbinol par réaction de l'acide pyruvique avec la propionaldéhyde ; s'il y avait eu formation intermédiaire d'acide α propionyllactique dans ce dernier exemple, sa décarboxylation aurait donné le propionylméthylcarbinol et dans l'expérience de NEUBERG, il se serait formé le benzoylméthylcarbinol. 3° Il a été montré que des extraits d'*E. coli*, qui ne forment l'acétoïne qu'à partir de pyruvate + éthanal ne contiennent pas la carboxylase α acétolactique.

Il faut donc admettre que le système enzymatique de la levure est différent de celui des bactéries précédemment citées. Puisque la levure ne forme pas d'acétoïne à partir d'éthanal seul, il apparaît que l'éthanal ajouté ne se condense pas avec de l'éthanal libre formé par décarboxylation de l'acide pyruvique. OCHOA pense que cette condensation se fait entre un complexe éthanal-enzyme, dérivant du pyruvate, et l'éthanal ajouté. Il admet les réactions suivantes :

a) Acide pyruvique + enzyme → éthanal-enzyme + CO_2

b) Ethanal-enzyme + ac. pyruvique → ac. α acétolactique + enzyme
↓
acétoïne + CO_2

c) Ethanal-enzyme + éthanal → acétoïne + enzyme

d) Ethanal-enzyme → éthanal + enzyme.

La somme des réactions *a* et *b* représente la synthèse acétoïnique

chez les bactéries ; la somme des réactions *a* et *c* représente la réaction chez la levure.

L'éthanal qui se condense avec le complexe éthanal-enzyme dans la formation d'acétoïne au cours de la fermentation normale, provient de l'action de la carboxylase représentée par la somme des réactions *a* et *d*.

Silverman et Werkman (129) étudiant *A. aerogenes* ont montré également que l'éthanal n'était pas impliqué tel quel dans la synthèse acétoïnique. Happold et Spencer (42) ont obtenu le même résultat et ont constaté qu'une addition d'acétate augmente la production d'acétoïne ; ils en concluent que l'acétate ou un corps voisin peut être le composé intermédiaire à deux carbones impliqué, ce qui n'est plus en accord avec les processus réactionnels d'Ochoa.

Ils envisagent donc dans le cas de la levure, où il n'y a pas passage par l'acide α acétolactique, une condensation qui pourrait former du diacétyle, intermédiaire symétrique que paraissent signaler les études isotopiques :

$$CH_3COOH + HOC-CH_3 \xrightarrow{-H_2O} CH_3CO\,CO\,CH_3 \xrightarrow{+2H} CH_3CHOH\,CO\,CH_3.$$

Les résultats de nos expériences, décrites en détail dans le chapitre des fermentations déviées, montrent aussi qu'une addition d'acide acétique augmente le taux des corps acétoïniques : acétoïne et son produit de réduction le 2,3-butanediol. Mais une addition d'acide pyruvique ou surtout d'éthanal l'augmente bien davantage. C'est ce qu'Happold et Spencer ont également remarqué pour les tissus de mammifère. On peut donc penser que l'acétate ou un dérivé acétyle est la forme « active » des chercheurs antérieurs, qui se condense avec l'éthanal.

Cette conception se rapproche de l'hypothèse de Martius (73) qui affirme que la première phase de la dégradation de l'acide pyruvique en présence de carboxylase est une déshydrogénation précédant la décarboxylation. Le radical $\begin{matrix} CH_2 - CO \\ | \quad\quad | \end{matrix}$ obtenu se condense avec l'éthanal pour former du diacétyle qui peut servir d'accepteur d'hydrogène et être réduit en acétoïne ; il y a donc passage dans les fermentations par les étapes diacétyle-acétoïne-2,3 butanediol. Suomalainen et Jännes (135) pensent avoir établi qu'une déshydrogénation de l'acide pyruvique précède la formation de l'acétoïne par la levure et qu'un passage par le terme diacétyle est probable ; ils estiment avoir démontré la formation de ce composé dans des fermentations anaérobies de l'acide pyruvique.

D'autre part, Akabori et Shimazu (1) ont établi que le diacétyle réagit avec l'éthanal en présence de levure, de muscle ou de foie de lapin en donnant de l'acétoïne et de l'acide acétique :

$$CH_3\,CO\,CO\,CH_3 + CH_3\,CHO \xrightarrow{H_2O} CH_3CO\,CHOH\,CH_3 + CH_3\,COOH$$

cette réaction étant favorisée par une addition de thiamine.

Ils supposent l'existence dans les liquides biologiques du système d'oxydoréduction diacétyle-acétoïne et pensent que la nécessité de la cocarboxylase pour la réaction précédente peut être expliquée en écrivant la dismutation du diacétyle de la façon suivante :

$$CH_3\,CO\,CO\,CH_3 + H_2O \rightarrow CH_3\,COOH + CH_3CHO$$
$$CH_3\,CO\,CO\,CH_3 + CH_3\,CHO \rightarrow CH_3\,CO\,CHOH\,CH_3 + CH_3\,COOH$$

Les auteurs pensent que la première de ces réactions est une réaction analogue à la décarboxylation de l'acide pyruvique et doit nécessiter la cocarboxylase.

Green et collaborateurs (39) ont isolé une diacétylmutase très spécifique du diacétyle, demandant la diphosphothiamine et qui catalyse la réaction :

$$2CH_3\,CO\,CO\,CH_3 \rightarrow 2CH_3COOH + CH_3\,CHOH\,CO\,CH_3$$

qui est la somme des deux réactions précédentes.

Considérant ces travaux et nos propres résultats, nous pensons que l'acide pyruvique peut subir une décarboxylation oxydative couplée avec une réduction, peut-être une dismutation de l'éthanal, produit par la décarboxylation, en acide acétique et alcool éthylique :

$$2CH_3\,CO\,COOH \rightarrow 2CH_3\,CHO + 2CO_2$$
$$2CH_3\,CHO \xrightarrow{H_2O} CH_3\,CH_2\,OH + CH_3\,COOH$$

L'acide acétique formé (ou un composé acétyle voisin) se condenserait avec l'éthanal produit au cours de la fermentation ou ajouté, en donnant de l'acétoïne avec passage possible par l'intermédiaire du diacétyle ; on pourrait l'écrire :

$$CH_3\,CHO + CH_3\,COOH \rightarrow CH_3\,CO\,CO\,CH_3 + H_2O \qquad (1)$$

réaction dépendant de la carboxylase. Un autre fait à l'appui de cette hypothèse est la nécessité de la présence de thiamine que nous avons démontrée dans le chapitre III.

$$CH_3\,CO\,CO\,CH_3 + CH_3CHO \xrightarrow{H_2O} CH_3\,CO\,CHOH\,CH_3 + CH_3COOH \qquad (2)$$

Ce schéma expliquerait la plus grande importance d'une addition d'éthanal : il agirait à la fois comme donateur d'hydrogène et source du composé actif à 2 carbones. L'acide acétique est régénéré et semble avoir un rôle catalytique.

La réaction globale est bien :

$$2CH_3\,CHO \rightarrow CH_3\,CO\,CHOH\,CH_3.$$

On comprend que l'on n'ait jamais pu séparer une carboligase distincte de la carboxylase puisque celle-ci est nécessaire à la réaction (1).

Il restait à démontrer effectivement la formation de diacétyle au

cours de la fermentation du sucre. Nous avons recherché le diacétyle à l'aide de la réaction d'HOOREMAN, durant le premier et le deuxième jour de la fermentation d'un moût de raisin par un *Saccharomyces ellipsoïdeus* et nous en avons trouvé des quantités dosables : 0,7 et 0,5 mg par litre. Nous l'avons également dosé dans des vins où il se trouve à des taux généralement inférieurs à 1 mg par litre, mais allant jusqu'à 1,8 mg par litre dans un vin d'Algérie.

II. — ÉQUILIBRE ENTRE L'ACÉTOINE ET LE 2,3-BUTANEDIOL

L'acétoïne se forme toujours au cours des fermentations alcooliques. C'est en effet ce que montrent nos analyses : toutes les levures forment de l'acétoïne et du 2,3-butanediol, ce dernier étant produit par réduction de l'acétoïne. STAHLY et WERKMAN (132) au cours d'une étude de la formation de ces composés par *Aerobacillus polymyxa*, ont suggéré la possibilité pour ces deux corps de former un système réversible d'oxydoréduction, puisque un bas potentiel rédox favorise l'accumulation du glycol et un potentiel rédox élevé celle du carbinol. Mais ce fait ne constitue pas une preuve de l'existence d'un système réversible et d'ailleurs BROCKMANN et WERKMAN (15) ont montré, en ajoutant des donateurs d'hydrogène à des bactéries du genre *Aerobacter* qu'un tel système n'existe probablement pas. Il semble, d'après la discussion qui précède, qu'un système d'oxydoréduction puisse être constitué par le diacétyle et l'acétoïne, ainsi que le pensent AKABORI et SHIMAZU ; la réduction ultérieure du carbinol en glycol est logiquement favorisée par l'existence d'un bas potentiel rédox.

CONCLUSIONS

L'étude du mécanisme de la formation des produits butanedioliques : acétoïne et 2,3-butanediol mériterait d'être davantage approfondie. Mais de telles recherches devraient être conduites avec des enzymes purifiés et demandent l'emploi de techniques telles que l'étiquetage par des isotopes lourds ou radioactifs, qui ne sont pas actuellement à notre portée.

La discussion qui précède constitue d'abord une mise au point de l'état actuel des travaux sur la question qui a été étudiée presque uniquement par des auteurs étrangers. Nous apportons deux faits nouveaux qui nous paraissent essentiels à l'interprétation de ces phénomènes : la formation constante de petites quantités de diacétyle, argument qui autorise à considérer le diacétyle comme corps intermédiaire, et surtout le fait que la carence en thiamine diminue spécifiquement la formation des dérivés butanedioliques.

Chapitre VIII

CONCLUSIONS GÉNÉRALES

Notre travail nous a conduits à un certain nombre de résultats, que nous allons résumer, concernant les variations des produits secondaires avec les conditions de la fermentation, et les mécanismes de leur formation.

Nous avons dû tout d'abord étudier des méthodes de dosage de tous les corps considérés applicables dans les milieux fermentés. Nous avons ainsi été amenés à proposer pour l'acide succinique, sur le principe des méthodes classiques, un nouveau mode opératoire beaucoup plus simple que ceux mis en œuvre jusqu'à maintenant. Il comprend une seule extraction à l'éther en milieu acide dans un appareil continu, suivie de l'élimination des acides fixes par oxydation permanganique en milieu sulfurique et des acides volatils par distillation à la vapeur ; l'acide succinique est titré par la baryte N/20, de pH 4,18 à 7,5 ; on titre ainsi les 7/10 de l'acide succinique de la prise d'essai.

Nous avons également précisé les conditions d'application aux milieux de fermentation riches en éthanol des méthodes d'Hooreman pour le dosage de l'acétoïne, du diacétyle et du 2,3-butanediol.

Nous avons appliqué l'équation d'équivalence entre les produits secondaires et le glycérol dans un grand nombre de cas et dans des conditions très variables. Nous en avons défini les limites de validité. Cette technique des bilans peut se trouver en défaut, lorsqu'on l'applique à un milieu naturel, dans certaines conditions que nous tenons à rappeler :

— le milieu contient de l'acide glutamique en quantité assez grande et peu d'azote ammoniacal. Il peut se former alors une proportion sensible d'acide succinique à partir de l'acide glutamique ;

— il se forme pendant la fermentation de l'acide acétique par voie oxydative pour des levures à forte intensité respiratoire ;

— il se forme dans certaines fermentations naturelles de l'acide acétique par intervention des bactéries, par exemple les bactéries malolactiques dans le cas des vins ;

— enfin, le milieu fermentescible peut déjà contenir certains produits secondaires, du glycérol, de l'acide acétique dans les raisins attaqués par le *Botrytis cinerea*, de l'acide succinique dans certains jus de fruits.

Pour pouvoir appliquer ces bilans, il faut donc réaliser des fermentations très pures, à l'abri de l'air ou en aérobiose, dans des conditions ne permettant pas les phénomènes oxydatifs.

I. — INFLUENCE DE LA RACE DE LEVURE SUR LA FORMATION DES PRODUITS SECONDAIRES

Nous avons étudié les produits secondaires formés par un certain nombre de levures appartenant au genre *Saccharomyces* et à d'autres genres : *Kloeckera, Saccharomycodes, Hansenula, Torulopsis*, etc.

Nous avons trouvé que pour tous les *Saccharomyces*, les *Saccharomycodes* et certaines *Torulaspora*, se vérifie l'équation des produits secondaires proposée par L. Genevois :

$$5s + 2a + b + 2m + h = \Sigma \leqslant g$$

même en milieu aéré ; elles ont donc un métabolisme uniquement fermentatif.

Un autre groupe de levures comprenant le type *Torulopsis* et le type *Hansenula* ne vérifient pas ce bilan même si l'aération est très faible ; elles forment de grosses quantités d'acide acétique, dont une part est due à la respiration.

Enfin les levures des genres *Kloeckera* et *Hanseniaspora* vérifient le bilan précédent si l'aération est très faible et non en milieu plus aéré où elles respirent en même temps qu'elles fermentent.

En ne considérant que la fermentation, on constate que les levures se différencient non par le taux de la fermentation glycéropyruvique qui varie assez peu d'une levure à l'autre, mais par l'utilisation qu'elles font de l'éthanal contre-partie du glycérol ; cette utilisation dépend de leur composition enzymatique. Remarquons que cette étude montre l'analogie du métabolisme de levures très différentes au point de vue morphologique.

II. — INFLUENCE DES CONDITIONS DE LA FERMENTATION SUR LA FORMATION DES PRODUITS SECONDAIRES

A. — Aération

L'étude de la formation des produits secondaires par deux *Saccharomyces ellipsoïdeus* dans des conditions d'aération croissante, nous a montré l'importance de ce facteur qui, conditionnant l'intensité de la respiration, détermine l'orientation de l'éthanal.

La formation du glycérol et celle de l'acide succinique augmentent avec l'importance de l'aération, le taux d'acide acétique est au contraire diminué. On n'observe pas de variation systématiquement opposée de l'acétoïne et du 2,3-butanediol, ce qui est contraire à l'hypothèse de l'existence d'un système réversible d'oxydoréduction entre ces deux corps.

B. — Concentration en ions hydrogène

Nous avons fait varier le pH des milieux d'étude de 2,6 à 8,0 et constaté que le taux de la fermentation glycéropyruvique augmente rapidement avec le pH au-dessus de pH 5 ; il y a en milieu alcalin une formation très élevée de glycérol et d'acide acétique. Le taux d'acide succinique augmente aussi avec le taux de la fermentation glycéropyruvique : il se forme deux fois plus d'acide succinique à pH 8 qu'à 2,6 ; les produits acétoïniques diminuent à pH élevé. La diminution de la concentration en ions hydrogène favorise donc les mécanismes des fermentations secondaires. Mais en anaérobiose, malgré les fortes variations des différents produits, le rapport Σ/g varie seulement entre 0,86 et 1,03 ; le bilan des produits secondaires se vérifie même pour des teneurs très élevées en glycérol et en acide acétique, autrement dit Σ/g reste relativement constant malgré de fortes variations des proportions des produits secondaires.

C. — Température

Nous avons déterminé les produits secondaires dans des milieux fermentant à des températures allant de 15 à 35°C. Le taux de fermentation glycéropyruvique augmente un peu avec la température, mais on n'observe pas de forte variation pour aucun des produits, bien que la température agisse sur les réactions d'utilisation de l'éthanal.

D. — Nature du milieu

Les taux des différents produits secondaires varient beaucoup avec la nature et la composition du milieu de fermentation ; nous avons expérimenté avec des milieux naturels : moûts de raisin, de bière, jus de cerises, pêches, tomates, et oranges, et avec un milieu minéral synthétique. Les milieux ayant été amenés au même pH et à la même teneur en sucre, nous avons observé que le 2,3-butanediol a varié de 1 à 2, l'acétoïne de 1 à 5, l'acide succinique de 1 à 3, l'acide acétique de 1 à 2 ; le glycérol est également très différent d'un milieu à un autre. Le milieu intervient donc par son taux en coenzymes et en facteurs de croissance.

E. — Influence des facteurs de croissance

L'absence d'acide pantothénique, de mésoinositol, de thiamine et de biotine dans le milieu de fermentation se traduit par des modifications importantes dans le taux des produits secondaires formés. L'absence d'acide pantothénique élève la proportion de fermentation glycéropyruvique et augmente de ce fait les récoltes d'acide acétique et de 2,3-butane-

diol ; l'accumulation d'acide acétique peut être due également à sa non utilisation dans ce milieu carencé. L'absence de mésoinositol ou de biotine diminue au contraire la formation de glycérol et d'acide succinique, mais n'a pas d'action nette sur les autres produits secondaires.

Enfin la carence en thiamine se traduit par une diminution marquée des corps acétoïniques.

Plusieurs facteurs de croissance agissent donc sur les mécanismes de la formation des produits secondaires. Ce rôle qui n'était pas encore connu s'explique si l'on considère que la plupart de ces facteurs agissent comme coferments des enzymes impliqués dans les processus de la fermentation.

L'influence de la teneur en sucre et l'action de certains activeurs de la fermentation ont encore fait l'objet d'études sur la formation des produits secondaires.

III. — ÉVOLUTION DE L'ÉTHANAL LIBRE AU COURS DE LA FERMENTATION

Nous avons suivi dans différentes conditions l'évolution de la teneur en éthanal libre, toujours présent au cours de la fermentation. Cette teneur est en rapport avec deux facteurs, le taux de la fermentation glycéropyruvique et la vitesse d'utilisation de l'éthanal par les enzymes responsables de la formation des produits secondaires. La teneur en éthanal augmente rapidement au début, au moment où le taux de la fermentation glycéropyruvique est grand pendant la phase d'induction ; puis elle passe par un maximum et décroît ; à ce moment, le taux de la fermentation glycéropyruvique est moins élevé et la vitesse d'utilisation de l'éthanal, qui semble être à peu près constante durant tout le cours de la fermentation l'emporte sur sa formation.

Le maximum est plus élevé en anaérobiose qu'en aérobiose bien que la somme des produits secondaires formés n'y soit pas plus grande ; ceci est dû sans doute au fait que les enzymes d'utilisation de l'éthanal sont plus actifs ou à des taux plus élevés en milieu aéré.

La température paraît n'avoir que peu d'influence sur l'évolution de l'éthanal ; il semble cependant qu'à 35°C, la teneur en éthanal soit plus forte au début de la fermentation, ce qui correspondrait à un taux plus élevé de fermentation glycéropyruvique.

L'addition d'un activeur d'origine fongique, du type signalé par Nielsen (poudre de mycélium séché d'*Aspergillus niger*), supprime la différence entre fermentations aérobie et anaérobie et modifie la courbe d'évolution de l'éthanal ; celle-ci monte plus brutalement au départ, ce qui correspond à une augmentation du taux de la fermentation

glycéropyruvique, mais le maximum atteint est très inférieur à celui des témoins. Cet activeur apporte des diastases qui augmentent la vitesse d'utilisation de l'éthanal, donc diminuent la teneur en éthanal libre et suppléent à la carence en enzyme de la levure lorsqu'elle travaille en anaérobiose. Il modifie également la formation des produits secondaires en favorisant surtout celle de l'acide succinique.

Les différents genres de levures donnent des courbes d'évolution d'éthanal libre différentes ; on constate en gros que les levures qui forment le plus d'acide succinique sont celles qui présentent les teneurs les plus faibles en éthanal libre au cours de la fermentation. Ce fait constitue un argument en faveur de l'hypothèse qui fait dériver l'acide succinique de l'éthanal.

IV. — FERMENTATIONS DÉVIÉES ET PRODUITS SECONDAIRES

L'étude de fermentations déviées par addition d'éthanal ou d'acide pyruvique nous a montré que les produits secondaires : acide acétique, acide succinique, acétoïne, 2,3-butanediol dérivent de l'éthanal ou d'un de ses précurseurs ; il en est de même pour l'acide citrique. Quant à l'acide lactique, il paraît se former par hydrolyse de la phosphoglycéraldéhyde.

D'autre part l'étude de l'évolution de l'éthanal libre et des acides volatils au cours de fermentations déviées par addition d'acide acétique ou d'acide formique et le dosage des produits secondaires en fin de fermentation ont fait apparaître des résultats importants :

— La présence d'acide acétique dans un moût en fermentation ne semble pas provoquer une formation plus grande d'acide succinique ; cependant nous montrerons plus loin que la formation de l'acide succinique fait intervenir l'acide acétique.

— En présence d'un acide volatil, il y a une diminution très nette du taux de la fermentation glycéropyruvique. Ceci s'explique par l'accumulation d'éthanal, dont la teneur maximum est le double ou le triple de celle du témoin ; la fermentation normale est favorisée au détriment de la fermentation glycéropyruvique.

— Malgré la diminution du taux de fermentation glycéropyruvique, les produits acétoïniques, acétoïne et 2,3-butanediol, sont très augmentés surtout en présence d'acide formique.

— La teneur en acide acétique est restée à peu près stationnaire dans les fermentations en présence d'acide acétique. En suivant son évolution en présence d'acide formique, on constate que sa formation est empêchée tout au début, puis freinée pendant un certain temps ; cette période de freinage semble correspondre à l'accumulation d'éthanal,

et on peut penser qu'il y a entre les deux phénomènes, une relation de cause à effet.

— L'acide formique ajouté avant fermentation diminue d'une façon très variable suivant la levure ; il ne donne pas de formol et très peu de méthanol. D'autre part, le bilan des produits secondaires montre que Σ est souvent supérieur à g en présence d'acide formique ; on peut donc penser que celui-ci est transformé, dans une proportion très variable avec la levure, en produits secondaires, en particulier en produits acétoïniques qui sont très augmentés.

— La formation d'acide lactique est légèrement plus élevée surtout en présence d'acide acétique.

Le taux d'acide citrique n'est pas augmenté par l'addition d'acide formique.

V. — DISCUSSION SUR LA FORMATION DE L'ACIDE SUCCINIQUE

Nous avons montré expérimentalement que l'addition d'acide glutamique, d'acide fumarique ou d'acide oxalacétique à une fermentation augmente le taux d'acide succinique. Une petite partie de cet acide, en rapport avec la teneur du milieu en acide glutamique, doit donc se former par le mécanisme d'EHRLICH, mais la plus grande part dérive du sucre ; l'augmentation due à une addition d'acide oxalacétique ou d'acide fumarique semblerait indiquer que ces acides sont des intermédiaires. Mais on ne peut pas affirmer que l'acide succinique se forme à partir de l'acide pyruvique par carboxylation conduisant à l'acide oxalacétique, suivie d'une réduction, car ce mécanisme observé chez les bactéries n'a pas pu être mis en évidence chez la levure. Par contre nous avons constaté que l'acide succinique formé à la fin d'une fermentation en présence d'acétate de sodium marqué $^{14}CH_3$ COO Na est radioactif. Ceci est une confirmation de l'hypothèse qui explique la formation de l'acide succinique par déshydrogénation et condensation de deux molécules d'acide acétique.

VI. — DISCUSSION SUR LA FORMATION D'ACETOINE ET DE 2,3-BUTANEDIOL

En nous appuyant sur les résultats des expériences des fermentations déviées (à savoir l'augmentation de production des corps acétoïniques par addition d'acide acétique, d'éthanal et d'acide pyruvique) et sur le fait que nous avons trouvé un peu de diacétyle au cours de la fermentation, nous avons discuté le mécanisme possible de formation de l'acétoïne, qui a déjà fait l'objet de nombreuses recherches. Il semble que l'on puisse admettre une condensation éthanal-acétate conduisant au diacétyle, puis

une oxydoréduction entre une molécule de diacétyle et une autre molécule d'éthanal :

$$CH_3\,CHO + CH_3\,COOH \rightarrow CH_3\,CO\,CO\,CH_3 + H_2O$$

$$CH_3\,CO\,CO\,CH_3 + CH_3\,CHO \xrightarrow{H_2O} CH_3\,CO\,CHOH\,CH_3 + CH_3\,COOH.$$

Nous avons mis en évidence le rôle très important de la thiamine, qui paraît conditionner la formation des dérivés acétoïniques. Cette observation montre que le complexe carboxylasique est à la base de la formation de ces corps.

Nous avons enfin brièvement discuté la possibilité d'un équilibre d'oxydoréduction acétoïne-2,3-butanediol.

Nous avons donc vérifié que l'équation des produits secondaires proposée en 1936 par L. GENEVOIS est expérimentalement valable dans la plupart des cas de fermentations pures. Nous avons étudié les facteurs qui agissent sur chacun de ses termes et nous avons abordé les problèmes des réactions intermédiaires mises en jeu pour leur formation. Si quelques mécanismes demeurent encore obscurs, nous pensons cependant avoir rassemblé un certain nombre de faits susceptibles d'éclairer différents aspects de ces problèmes.

BIBLIOGRAPHIE

(1) AKABORI (S.) et SHIMAZU (Y.). — *Proc. Japan Acad.*, 1952, **28**, 36.
(2) ALBAHARY. — *Ann. Falsif. Fraudes*, 1912, **5**, 147.
(3) ANDRÉ (P.) et DUPUY (P.). — *Ann. Technologie*, 1952, **2**, 213.
(4) ANDRÉ (P.) et DUPUY (P.). — *Ann. Technologie*, 1953, **2**, 31.
(5) ANTONIANI (C.). — *VIIe Congrès Intern. Ind. Agric.*, Paris, 1948, t. II, p. 194. *Ann. Chim. Applicata*, 1948, **38**, 39. *Atti. Accademia Georgofili*, 1949.
(6) ANTONIANI (C.) et GUGNONI (S.). — *Ann. Chim. Applicata*, 1941, **31**, 417.
(7) ANTONIANI (C.) et TROTTA (A.). — *Ann. Acad. Agrar. Torino*, 1946-1947, t. 89. ANTONIANI (C.). *Ind. agrar. progr. vinic.*, 1947.
(8) BABIN (R.). — *Bull. Soc. Pharm. Bordeaux*, 1953, **91**, 173.
(9) BECHAMP (A.). — *C. R. Acad. Sci.*, 1863, **56**, 969, 1086 et 1231.
(10) BERNHAUER (K.). — *Ergeb. Enzymforschung*, 1934, **3**, 184.
(11) BERG (R. L.) et WESTERFELD (W. W.). — *J. Biol. Chem.*, 1944, **152**, 113.
(12) BOUSSINGAULT (J.). — *C. R. Acad. Sci.*, 1880, **91**, 373.
(13) BRECHOT (P.) et HAAG (E.). — *C. R. Acad. Sci.*, 1939, **208**, 1847.
(14) BROCKMANN (M. C.) et STIER (T. J. B.). — *Journ. Amer. Chem. Soc.*, 1948, **70**, 413.
(15) BROCKMANN (M. C.) et WERKMAN (C. H.). — *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 1933, **30**, 1146.
(16) CASTELLI (T.). — *Ann. Microbiologia*, 1941, **19**, 269. *Ibid.*, 1941, **20**, 8.
(17) CASTOR (J. G. B.). — *Food Research*, 1953, **18**, 139.
(18) CLABORN (H. V.) et PATTERSON (W. I.). — *Journ. Assoc. Off. Agric. Chemists*, 1938, **31**, 134.

(19) Claudon (E.) et Morin (E. C.). — *C. R. Acad. Sci.*, 1887, **104,** 1109 et 1187.
(20) Connstein (W.) et Luedeke (K.). — *Ber. deutsch. chem. Ges.*, 1919, **52,** 1385.
(21) Cordebard. — *Journ. Pharm. Chim.*, 1939, **30,** 263.
(22) Dirscherl (N.). — *Zeits. phys. Chem.*, 1930, **188,** 225 ; 1931, **201,** 47 et 78 ; 1933, **219,** 177. Dirscherl (N.) et Schollig. *Zeits. phys. Chem.*, 1938, **252,** 53 et 70. *Ber. deutsch. chem. Ges.*, 1938, **71,** 418. Dirscherl (N.) et Nahm. *Zeits. phys. chem.*, 1940, **264,** 41.
(23) Duclaux (E.). — *C. R. Acad. Sci.*, 1874, **78,** 1160.
(24) Dumas (J. B.). — *Ann. Chim. Phys.*, 1874, **3,** 57.
(25) Ehrlich (F.). — *Biochem. Z.*, 1909, **18,** 391.
(26) Espil (L.). — *Bull. Soc. Chim.*, 1937, **4,** 1626.
(27) Federico (L.). — *Annali di Chimica*, 1950, **40,** 644.
(28) Fernbach (A.) et Schoen (M.). — *C. R. Acad. Sci.*, 1913, **157,** 1478.
(29) Fernbach (A.) et Schoen (M.). — *C. R. Acad. Sci.*, 1914, **158,** 1719.
(30) Fernbach (A.) et Schoen (M.). — *C. R. Soc. Biol.*, 1923, **89,** 475.
(31) Genevois (L.). — *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1936, **18,** 295.
(32) Genevois (L.). — *Ind. Agric. Alim.*, 1949, **66,** 329. *Bioch. Bioph. Acta*, 1950, **4,** 179. *Rev. Ferm. Ind. Alim.*, 1951, **6,** 18, 43, 88 et 111. *Bull. Ass. Microbiol.* Nancy, 1951, n° 44.
(33) Genevois (L.). — *Bull. Soc. Chim.*, 1954, **21,** 450.
(34) Genevois (L.). — *Mitt. Versuch. Gärungsgewerbe*, 1949, n° 7-8.
(35) Genevois (L.). — *Ind. Agric. Alim.*, 1952, **69,** 27.
(36) Genevois (L.), Peynaud (E.) et Ribereau-Gayon (J.). — *C. R. Acad. Sci.*, 1946, **223,** 693 ; 1947, **224,** 762 et 1388. Genevois (L.), Peynaud (E.) et Ribereau-Gayon (J.). *C. R. Acad. Sci.*, 1948, **226,** 126 et 439 ; 1948, **227,** 227 ; 1949, **229,** 479 et 777. Peynaud (E.). *Ind. Agric.Alim.*, 1948, **65,** 99. Genevois (L.), Peynaud (E.) et Ribereau-Gayon (J.). *Rev. Ferm. Ind. Alim.*, 1947, **2,** 103. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1949, **31,** 369.
(37) Gentilini (L.). — *Ann. Staz. vitic. enol. Conegliano*, 1940, **10,** 255.
(38) Gobis (L.). — *Ann. Sperim. agrar.*, 1950, **4,** 569.
(39) Green (D. E.), Stumpf (P. K.) et Zarudnaya (K.). — *J. Biol.Chem.*, 1947, **167,** 811.
(40) Gross (N. H.), Wood (H. G.) et Werkman (C. H.). — *J. Bact.*, 1942, **44,** 257. Gross (N. H.) et Werkman (C. H.). — *Arch. Biochem.*, 1947, **15,** 125.
(41) Haehn (H.). — *Biochemie der Gärungen.* W. de Gruyter, Berlin 1952.
(42) Happold (F. C.) et Spencer (C. P.). — *Bioch.* et *Bioph. Acta*, 1952, **8,** 543.
(43) Henninger (A.). — *C. R. Acad. Sci.*, 1882, **95,** 94.
(44) Henninger (A.) et Sanson. — *C. R. Acad. Sci.*, 1888, **106,** 208.
(45) Hofmann (E.). — *Biochem. Z.*, 1931, **243,** 429.
(46) Hooreman (M.). — Contribution à l'étude de la fermentation butanediolique. Thèse Sciences, Paris 1948.
(47) Jacquin (P.) et Tavernier (J.). — *Ann. Technologie*, 1953, **2,** 113.
(48) Jaulmes (P.) et Espezel (P.). — *Ann. Falsif. Fraudes*, 1935, **28,** 325.
(49) Joslyn (M. A.) et Dunn (R.). — *Journ. Amer. Chem. Soc.*, 1938, **60,** 1137.
(50) Juni (E.). — *Federation Proc.*, 1950, **9,** 396.
(51) Juni (E.). — *J. Biol. Chem.*, 1952, **195,** 727.
(52) Kalnitsky (G.) et Werkman (C. H.). — *Arch. Biochem.*, 1944, **4,** 25.
(53) Kayser (E.). — *Ann. Inst. Pasteur*, 1892, **6,** 569.
(54) Kayser (E.) et Demolon (A.). — *C. R. Acad. Sci.*, 1907, **145,** 205 ; 1908, **146,** 783.
(55) Kayser (E.) et Dienert (F.). — *Ann. Brass. Dist.*, 1901, **4,** 199.

(56) KIESSLING (W.). — *Ind. Agric. Alim.*, 1949, **66,** 111.
(57) KLEINZELLER (A.). — *Biochem. Journ.*, 1941, **35,** 495.
(58) KLUYVER (A. J.), DONKER (H. J. L.) et VISSER'T HOOFT (F.). — *Biochem. Z.*, 1925, **161,** 361.
(59) KOSTYTSCHEW (S.). — *Zeits. phys. Chem.*, 1912, **79,** 130.
(60) KOSTYTSCHEW (S.) et HUBBENNET (E.). — *Zeits. phys. Chem.*, 1912, **79,** 359. *Ber. deutsch. chem. Ges.*, 1912, **45,** 1289.
(61) KRAMPITZ (L. O.), WOOD (H. G.) et WERKMAN (C. H.). — *J. Biol. Chem.*, 1943, **147,** 243.
(62) KREBS (H. A.). — Le cycle des acides tricarboxyliques. Exposés annuels de Biochimie médicale, X^e série, 1949, p. 31.
(63) KUNZ. — *Zeits. Untersuch. Narhungsmittel.*, 1903, p. 721. HEIDE-SCHWENCK. *Rev. Chim. Anal.*, 1913, **21,** 81.
(64) LABORDE (J.). — *C. R. Acad. Sci.*, 1899, **129,** 344.
(65) LABORDE (J.). — *C. R. Acad. Sci.*, 1917, **165,** 793. *Bull. Soc. Chim.*, 1918, **23,** 447.
(66) LAFON (M.). — *Bull. Soc. Chim.*, 1954, **21,** 166.
(67) LAFON (M.). — *C. R. Acad. Sci.*, 1954, **238,** 847.
(68) LAFOURCADE (S.). — Contribution à l'étude des activeurs et des inhibiteurs de la fermentation alcoolique du moût de raisin. Thèse Ingénieur-Docteur, Bordeaux 1954. PEYNAUD (E.) et LAFOURCADE (S.). *Xe Congrès Intern. Ind. Agric. Alim.*, Madrid 1954.
(69) LANGENBECK (W.), WREDE (H.) et SCHLOCKERMANN (W.). — *Zeits. phys. Chem.*, 1934, **227,** 263.
(70) LEDEDEW (A. V.) et GRIAZNOFF. — *Ber. deutsch. chem. Ges.*, 1912, **45,** 3256.
(71) MACAGNO. — *Bull. Soc. Chim.*, 1875, **24,** 288.
(72) MARIGNAN (R.). — Thèse Pharmacie, Montpellier 1944.
(73) MARTIUS (C.). — *Zeits. phys. Chem.*, 1943, **279,** 96.
(74) MESTREZAT. — *C. R. Acad. Sci.*, 1906, **143,** 185.
(75) MEYERHOF (O.). — *Biochem. Z.*, 1925, **162,** 44.
(76) MEYERHOF (O.), KIESSLING (W.) et SCHULZ (W.). — *Biochem. Z.*, 1937, **292,** 25.
(77) MILHAUD (G.), AUBERT (J. P.) et GAVARD (R.). — *C. R. Acad. Sci.*, 1952, **234,** 2026.
(78) MULLER. — *Bull. Soc. Chim.*, 1896, **15,** 1204.
(79) MULLER-THURGAU (H.) et OSTERWALDER (A.). — *Landw. Jahrbuch. der Schweitz*, 1914, **28,** 480. 1915, **29,** 40.
(80) MUTTELET. — D'après *Ann. Falsif. Fraudes*, 1932, **25,** 416.
(81) NEISH (A. C.). — *Can. Journ. Research*, 1949, **27,** 6.
(82) NEISH (A. C.) et BACKWOOD (A. C.). — *Can. Journ. Technology*, 1951, **29,** 123.
(83) NEUBAUER (O.) et FROMHERZ (K.). — *Zeits. phys. Chem.*, 1910, **70,** 326.
(84) NEUBERG (C.) et FARBER (E.). — *Biochem. Z.*, 1916, **78,** 238.
(85) NEUBERG (C.) et HILDESHEIMER (A.). — *Biochem. Z.*, 1911, **31,** 170. NEUBERG (C.) et KARCZAG (L.). *Ibid.*, 1911, **36,** 60, 68 et 76 ; 1912, **43,** 44 et 491 ; 1912, **47,** 405. NEUBERG (C.). *Biochem. Z.*, 1915, **71,** 1.
(86) NEUBERG (C.) et HIRSCH (J.). — *Biochem. Z.*, 1919, **96,** 175 ; 1919, **98,** 141 ; 1919, **100,** 304. NEUBERG (C.), HIRSCH (J.) et REINFURTH (E.). *Ibid.*, 1920, **105,** 307. NEUBERG (C.) et REINFURTH (E.). *Ibid.*, 1920, **106,** 281. NEUBERG (C.) et URSUM (W.). *Ibid.*, 1920, **110,** 193.
(87) NEUBERG (C.) et HIRSCH (J.). — *Biochem. Z.*, 1921, **115,** 282.
(88) NEUBERG (C.) et KERB (J.). — *Biochem. Z.*, 1914, **58,** 158. *Ber. deutsch. chem. Ges.*, 1914, **47,** 2730.
(89) NEUBERG (C.) et REINFURTH (E.). — *Biochem. Z.*, 1918, **89,** 365 ; 1918, **92,** 234. *Ber. deutsch. chem. Ges.*, 1919, **52,** 1677.

(90) NEUBERG (C.) et REINFURTH (E.). — *Biochem. Z.*, 1923, **143,** 553.
(91) NIELSEN (N.) et HARTELIUS (V.). — *C. R. Labo Carlsberg*, 1937, **22,** 1.
(92) NOVELLI (G. D.) et LIPMANN (F.). — *J. Biol. Chem.*, 1947, **171,** 833.
(93) OCHOA (S.). — *Physiol. Rev.*, 1951, **31,** 56.
(94) PASTEUR (L.). — *C. R. Acad. Sci.*, 1858, **46,** 179 et 857.
(95) PASTEUR (L.). — *C. R. Acad. Sci.*, 1859, **48,** 1149.
(96) PASTEUR (L.). — *Ann. Chim. Phys.*, 1860, **58,** 323.
(97) PELTIER (R.). — *P. V. Soc. Sci. Phys. Bordeaux*, 1913, **4.**
(98) PEYNAUD (E.). — *Bull. int. Vin*, 1938, **118,** 33.
(99) PEYNAUD (E.). — *Ann. Falsif. Fraudes*, 1938, **41,** 384.
(100) PEYNAUD (E.). — *Bull. Soc. Chim.*, 1946, **13,** 685. *Rev. Ferm. Ind.Alim.*, 1947, **2,** 150.
(101) PEYNAUD (E.). — Contribution à l'étude biochimique de la maturation du raisin et de la composition des vins. Thèse Ingénieur-Docteur,Bordeaux 1946.
(102) PEYNAUD (E.). — *Ann. Chim. Anal.*, 1946, **28,** 111.
(103) PEYNAUD (E.). — *Ann. Ferm.*, 1939, **5,** 321.
(104) PEYNAUD (E.). — *Ind. Agric. Alim.*, 1948, **65,** 99. GENEVOIS (L.), RIBEREAU-GAYON (J.) et PEYNAUD (E.). *C. R. Acad. Sci.*, 1947, **224,** 762.
(105) PEYNAUD (E.). — *Rev. Vitic.*, 1938, **88,** 88.
(106) PEYNAUD (E.) et CHARPENTIE (Y.). — *Ann. Falsif. Fraudes*, 1954, **47,** 85.
(107) PEYNAUD (E.) et CHARPENTIE (Y.). — *Ann. Falsif. Fraudes*, 1950, **43,** 246.
(108) PEYNAUD (E.) et DOMERCQ (S.). — *Ann. Technologie*, 1954, **3,** 265.
(109) PEYNAUD (E.) et LAFON (M.). — *Bull. Soc. Chim.*, 1951, **18,** 482. *Ann. Falsif. Fraudes*, 1951, **44,** 264 et 399.
(110) PEYNAUD (E.) et LAFON (M.). — *Ind. Agric. et Alim.*, 1952, **69,** 397.
(111) PEYNAUD (E.) et RIBEREAU-GAYON (J.). — *C. R. Acad. Sci.*, 1947, **224,** 1388.
(112) PLAUT (G. W. E.) et LARDY (H. A.). — *J. Biol. Chem.*, 1949, **180,** 13. KORKES (S.), DEL CAMPILLO (A.) et OCHOA (S.). *J. Biol. Chem.*, 1950, **187,** 891.
(113) POUX (C.) et OURNAC (A.). — *Ind. Agric. et Alim.*, 1949, **66,** 503.
(114) POZZI-ESCOT (M.). — *Rev. Chim. Anal.*, 1908, **16,** 439. *C. R. Acad. Sci.*, 1908, **147,** 600.
(115) PRITZKER (J.) et JUNGKUNZ (R.). — *Unters. Lebensm.*, 1930, **60,** 484.
(116) RANKINE (B. C.). — *Australian Journ. Applied Sci.*, 1953, **4,** 590.
(117) RAU. — *Rev. Chim. Anal.*, 1892, **2,** 215.
(118) RIBEREAU-GAYON (J.), LAFOURCADE (S.) et LAFON (M.). — *Ind. Agric. et Alim.*, 1950, **67,** 477.
(119) RIBEREAU-GAYON (J.) et PEYNAUD (E.). — *C. R. Acad. Sci.*, 1946, **222,** 457.
(120) RIBEREAU-GAYON (J.) et PEYNAUD (E.). — *Ann. Inst. Pasteur*, 1947, **73,** 777.
(121) RIBEREAU-GAYON (J.) et PEYNAUD (E.). — *C. R. Acad. Sci.*, 1953, **237,** 670. PEYNAUD (E.) et LAFON (M.). *Xe Congrès Intern. Ind. Agric. Alim.*, Madrid 1954.
(122) RIBEREAU-GAYON (J.), PEYNAUD (E.) et LAFON (M.). — *C. R. Acad. Sci.*, 1952, **234,** 757.
(123) RIBEREAU-GAYON (J.) , PEYNAUD (E.) et LAFOURCADE (S.). — *C. R. Acad. Sci.*, 1952, **234,** 251.
(124) RODOPOULO (A. K.). — *Mikrobiologija*, 1953, **22,** 530.
(125) ROESER (M.). — *Ann. Inst. Pasteur*, 1893, **7,** 41.
(126) SCHUTZENBERGER (P.) et DESTREM (A.). — *C. R. Acad. Sci.*, 1879, **88,** 593.
(127) SCHWEIZER. — *Helvetica Chim. Acta*, 1918, **2,** 167.

(128) SEBRELL (W. A.) et HARRIS (R. S.). — *The Vitamins*, Academic Press Inc., New-York 1954.
(129) SILVERMAN (M.) et WERKMAN (C. H.). — *J. Biol. Chem.*, 1941, **138**, 35.
(130) SLONIMSKI (P. P.). — *II*e *Congrès Intern. Biochimie*, 1952, *C. R.*, p. 94. EPHRUSSI (B.) et SLONIMSKI (P. P.). *C. R. Acad. Sci.*, 1950, **230**, 285. SLONIMSKI (P. P.). *La formation des enzymes respiratoires chez la levure*, Masson éd., Paris 1953.
(131) SLONIMSKI (P. P.) et HIRSCH (H. M.). — *C. R. Acad. Sci.*, 1953, **235**, 741.
(132) STAHLY (G. L.) et WERKMAN (C. H.). — *Biochem. Journ.*, 1942, **36**, 575.
(133) STEPANOV (A.) et KUSIN (A.). — *Ber. deutsch. chem. Ges.*, 1930, **63**, 1147.
(134) STRAUB. MACH et PORTELE. — D'après *Ann. Brass. Dist.*, 1901, **4**, 199.
(135) SUOMALAINEN (H.) et JÄNNES (L.). — *Nature*, 1946, **157**, 336.
(136) THUNBERG (T.). — *Skand. Arch. Physiol.*, 1920, **40**, 1.
(137) TOMIYASU (Y.). — *Biochem. Z.*, 1936, **289**, 97.
(138) TRILLAT (A.). — *C. R. Acad. Sci.*, 1908, **146**, 645. TRILLAT (A.) et SAUTON (B.). *C. R. Acad. Sci.*, 1908, **146**, 996.
(139) UTTER (M. F.) et WOOD (H. G.). — *J. Biol. Chem.*, 1946, **164**, 455.
(140) VEIGA SALLES (J. B.), HARARY (I.), BANFI (R. F.) et OCHOA (S.). — *Nature* (Londres), 1950, **165**, 675.
(141) VENTRE (J.). — *Rev. Vitic.*, 1934, **80**, 181.
(142) VENTRE (J.). — *Ann. Ferm.*, 1937, **3**, 447.
(143) VERGNAUD (P.). — *Ind. Agric. et Alim.*, 1949, **66**, 217.
(144) WATT (D.) et KRAMPITZ (L. O.). — *Federation Proc.*, 1947, **6**, 301.
(145) WESTERFELD (W. W.). — *Journ. Biol. Chem.*, 1945, **161**, 495.
(146) WIELAND (Th.) et SONDERHOFF (R.). — *Ann. der Chemie*, 1932, **499**, 213. SONDERHOFF (R.) et DEFFNER. *Ibid.*, 1936, **525**, 132. SONDERHOFF (R.) et THOMAS (H.). *Ibid.*, 1937, **530**, 195.
(147) WORTMANN. — *Landwirts. Jahrb.*, 1894, **23**.

APPLICATION DES TECHNIQUES CHROMATOGRAPHIQUES A L'ÉTUDE DE LA FERMENTATION MALOLACTIQUE DANS LES VINS DÉLIMITÉS DE QUALITÉ SUPÉRIEURE DE LA RÉGION DE TOULOUSE

PAR

Mlle **LAMAZOU-BETBEDER** et Mme **PECH**
Station Agronomique et Œnologique de Toulouse

PLAN DU MÉMOIRE

I. — But et importance de l'étude.

II. — Les vins délimités de qualité supérieure de la région de Toulouse.

III. — Méthode de caractérisation des acides organiques non volatils : la chromatographie sur papier.

IV. — Résultats et interprétation.

V. — Résumé et conclusions.

I. — But et importance de l'étude

La fermentation malolactique est une modification essentielle qui intervient souvent au cours de la conservation normale de certains grands vins rouges. Elle contribue à leur donner de la souplesse, du fondu, et à modifier agréablement leur bouquet. Elle se traduit par une diminution d'acidité ayant pour cause la transformation de l'acide malique en acide lactique par des bactéries, d'après l'équation :

$$COOH — CH^2 — CHOH — COOH \rightarrow CH^3 — CHOH — COOH + CO^2$$

Dans les régions de crus, on estime que les vins ne peuvent atteindre le maximum de qualité, sans avoir subi cette désacidification biologique (1). D'autre part, il a été affirmé que tous les vins doivent, tôt ou tard, être le siège de ce phénomène — l'acide malique entrant en proportion notable dans leurs constituants acides — à moins que certains facteurs ne s'opposent à l'action des microorganismes (2).

C'est pour vérifier la réalité de cette hypothèse dans les Vins délimités de qualité supérieure de la région de Toulouse que ce travail a été entrepris. L'existence de la fermentation malolactique demande à être établie, dans ce cas particulier, en raison même de la composition de ces boissons et à cause de son incidence sur la casse ferrique qui sévit parfois dans la région par suite, vraisemblablement, de l'abondance en fer de quelques sols.

Les moûts dont proviennent ces vins résultent du mélange, dans des proportions définies par les conditions d'appellation, de divers cépages dont certains paraissent comburer insuffisamment l'acide malique (3). Ce constituant instable dans le liquide amènera au fur et à mesure de la transformation — si elle a lieu — une désacidification plus ou moins importante suivant la répartition initiale des différents acides organiques dans le jus de raisin. Pour rechercher toutes les conséquences de ce fait, il convient en premier lieu de mettre en relief la manifestation de la fermentation malolactique.

L'étude de la dégradation sera faite par la caractérisation des acides malique et lactique, par chromatographie sur papier, suivant une technique qui a été récemment appliquée aux vins (4). Elle a permis de grouper un nombre important de déterminations qui ont porté sur des vins à appellation « Fronton-Côtes de Fronton » et « Villaudric » de catégories et d'âges différents dont les caractères vont être précisés.

II. — Les « Vins délimités de qualité supérieure » de la région de Toulouse

Les vignobles dont ils sont issus sont situés, entre le Tarn et la Garonne, sur les terrasses silico-argileuses du Tarn, sur un sol formé soit de boulbènes où parfois affleure le grepp sur lequel il repose, soit de cailloutis ou « graves », soit encore de sols plus argileux, connus dans la région sous le nom de « rougets ». Ils sont complantés de cépages « principaux » parmi lesquels le plant « Négrette » domine associé au Malbec, au Mauzac et de cépages dits « secondaires » entrant pour une faible proportion dans l'élaboration des vins (5-6).

Les raisins vinifiés généralement en rouge, parfois en rosé, donnent des produits de qualité ayant des caractères organoleptiques particuliers et très appréciés. Ils doivent satisfaire à des normes analytiques définies.

Le tableau I présente les caractéristiques d'un certain nombre de vins rouges types, classés par année.

Ces vins répondent aux règles exigées par l'appellation relatives à la teneur en alcool qui doit être égale ou supérieure à 10°5. Le degré alcoolique se situe généralement au-dessus du minimum imposé : la

moyenne pour 1953 atteint 10°9 et 12°2 pour les années antérieures (1945 à 1952). Ces résultats sont comparables à ceux qui avaient été mis en évidence dans différentes études (7-8).

TABLEAU I

Composition des Vins Rouges

Nos	Année	Degré	Acidités exprimées en milliéq. par litre			pH
			Totale	Volatile	Fixe	
1.....	1953	10°5	91,8	11,2	80,6	3,00
2.....	—	10°6	70,4	9,6	60,8	3,28
3.....	—	10°7	72,4	15,3	57,1	3,50
4.....	—	11°0	84,7	9,6	75,1	3,21
5.....	—	10°7	75,5	8,6	66,9	3,22
6.....	—	10°9	73,5	9,6	63,9	3,21
7.....	—	11°9	81,6	8,6	73,0	3,18
8.....	—	11°9	81,6	10,2	71,4	3,15
9.....	—	10°5	93,9	13,3	80,6	3,20
10.....	—	10°5	74,5	8,6	65,9	3,20
11.....	1952	11°6	75,5	12,2	63,3	3,21
12.....	—	11°7	74,5	10,2	64,3	3,20
13.....	—	11°8	74,5	10,2	64,3	3,25
14.....	—	11°0	79,6	16,3	63,3	3,45
15.....	1947	12°5	91,8	16,3	75,5	3,15
16.....	1945	14°8	89,8	19,4	70,4	3,60

L'acidité est peu élevée : cela provient d'une teneur assez faible en acides organiques des moûts et de ce que les vins ont subi la fermentation malolactique dans la plupart des cas, ainsi que le démontrera la suite de ce travail. Les pH sont assez élevés et s'échelonnent de 3.00 à 3.60.

Le tableau II rassemble la composition des vins rosés.

TABLEAU II

Composition des Vins Rosés

Nos	Année	Degré	Acidités exprimées en milliéq. par litre			pH
			Totale	Volatile	Fixe	
17.....	1953	11°9	90,8	7,6	83,2	3,00
18.....	1953	11°9	90,8	7,6	83,2	3,00
19.....	1952	11°9	79,6	9,6	70,0	3,10
20.....	1952	12°5	74,5	10,2	64,3	3,15
21.....	1950	13°2	92,9	10,6	82,3	2,95

La richesse en alcool, comprise entre 11°9 et 13°2, avec un degré moyen de 12°1, dépasse celle des vins rouges. L'acidité est généralement supérieure à celle des vins rouges et leur pH est plus faible.

Ces faits doivent être rappelés parce qu'ils constituent des facteurs essentiels dans la marche de la désacidification biologique.

De tels vins, rouges ou rosés, ont-ils été le siège de cette transformation ?

Pour répondre à cette question, la méthode de caractérisation des acides aliphatiques par chromatographie, a été employée.

III. — Caractérisation des acides malique et lactique par chromatographie sur papier

Cette méthode d'investigation, exposée récemment dans son application à l'étude de la fermentation malolactique des vins, permet la séparation des acides tartrique, malique et lactique. La technique présente quelques difficultés relatives à la préparation de la phase solvante. Rappelons que celle utilisée dans l'étude qui suit est désignée dans la nomenclature de Munier par PU (1/1) f 20. Dans le travail en cours, comme dans les études antérieures déjà rappelées, la sensibilité a été jugée satisfaisante.

Par capillarité, le solvant déplace, sur le papier chromatographique les divers acides organiques fixes du vin qui se situent à des niveaux différents caractérisés par leur Rf($Rf = \frac{d}{D}$ où d représente le cheminement de l'acide et D celui du solvant).

La révélation des taches est obtenue par pulvérisation d'une solution alcoolique de bleu de bromophénol : il apparaît trois rangées de spots qui s'étagent, de bas en haut, sur le papier, de la façon suivante : à la base l'acide tartrique, au-dessus l'acide malique et, réunis à la partie supérieure, les acides lactique et succinique, celui-ci donnant un spot faible. Dans certains essais, l'on remarque une tache peu apparente, située entre les acides malique et lactique ; cette tache a déjà été signalée et correspond à un acide non encore identifié (9).

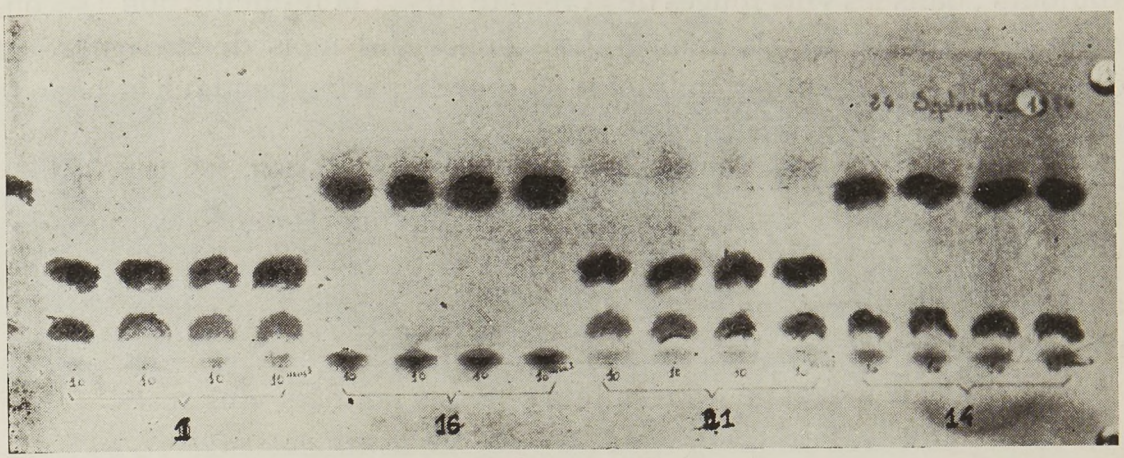
Dans les chromatogrammes effectués pour l'étude présente de la fermentation malolactique, des essais différents ont porté, pour un même vin, sur des prises croissantes, puis sur des prises de même volume, ce qui a permis de confirmer la fidélité de la méthode. Donné comme exemple de ce contrôle, le chromatogramme A, figurant ci-dessous, a été obtenu par quatre prises de 10 mm^3 pour chacun des quatre vins examinés, disposés intentionnellement de façon à ce que la répétition des essais et l'opposition des cas mettent en valeur cette qualité de la technique. La figure A montre très visiblement la constance des résultats.

Les chiffres 1, 16, 21, 14, représentent les numéros des échantillons.

L'absence des spots correspondant à l'acide tartrique, pour le nº 16,

est à remarquer : elle peut, vraisemblablement, s'expliquer par l'âge du vin (1945).

Chromatogramme A



IV. — Résultats et interprétation

Les tableaux III et IV donnent l'interprétation qualitative (1) des chromatogrammes, le premier pour l'année 1953, le deuxième pour les années antérieures. Le signe + indique la présence des acides, O indique l'absence de ces derniers ou, tout au moins, une quantité inférieure à la limite de perception qui est de 2 milliéq. 9 environ par litre pour l'acide malique (10).

TABLEAU III

N° des ééhantillons	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Année	1953	1953	1953	1953	1953	1953	1953	1953	1953	1953
Acide malique.	+	O	O	O	O	O	O	O	O	O
Acide lactique.	O	+	+	+	+	+	+	+	+	+

TABLEAU IV

N° des échantillons	11	12	13	14	15	16
Année	1952	1952	1952	1952	1947	1945
Acide malique	O	O	O	O	O	O
Acide lactique	+	+	+	+	+	+

Les vins ont subi la désacidification biologique sauf dans un seul cas. Le n° 1 ne renferme pas, en effet, d'acide lactique : il se différencie des

(1) Comme il a déjà été dit par M. RIBÉREAU-GAYON, la chromatographie permet des dosages approchés de l'acide malique :dans notre étude la méthode n'a été envisagée qu'au point de vue qualitatif.

produits de la même récolte, par un pH plus bas et une acidité plus élevée. La dégradation malolactique s'est effectuée vraisemblablement ici au-dessus d'un pH égal à 3, ce qui confirme des observations récentes (11).

Il paraît normal d'ailleurs que la transformation ait eu lieu, presque toujours, dans les vins rouges de la récolte 1953 : la fermentation « secondaire », favorisée par la température douce des mois de novembre et décembre a dû s'effectuer, au moins en grande partie, pendant la période qui a précédé les grands froids.

Dans les vins vieux d'âges différents la désacidification est complète, tout l'acide malique ayant disparu. Il semble que la modification s'est produite dans la plupart des cas pendant la première ou, tout au plus, au cours de la deuxième année de conservation, ainsi que le montre le comportement des appellations 1952.

Le tableau V groupe les résultats obtenus pour les vins rosés.

Tableau V

N° des échantillons	17	18	19	20	21
Année	1953	1953	1952	1952	1950
Acide malique	+	+	+	o	+
Acide lactique	o	o	+	+	o

Il résulte des indications qui figurent dans le tableau ci-dessus que :

— dans le n° 20 seulement la fermentation malolactique est terminée,

— pour le n° 19 la transformation est en cours,

— il n'y a pas trace d'acide lactique dans les nos 17, 18 et 21.

Les vins rosés de l'année 1952 se distinguent des autres par la désacidification dont ils sont le siège. Ils se différencient au point de vue analytique par leur pH et leur acidité de titration. En effet, les premiers ont un pH égal ou supérieur à 3.10 alors qu'il ne dépasse pas 3 dans les vins rosés qui ne contiennent pas d'acide lactique.

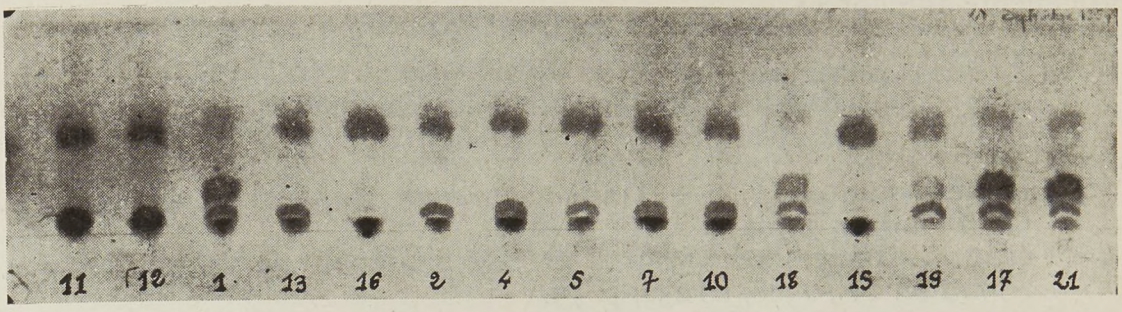
Les vins n° 19 et 20 se distinguent à leur tour entre eux par leur pH et leur acidité : la valeur de celle-ci ne dépasse pas 74.5 milliéq. lorsque l'acide malique a disparu alors qu'elle atteint encore 79.6 dans le cas où la transformation est en cours.

La fermentation malolactique ne s'effectue pas ici d'une façon aussi générale que dans les vins rouges dont les pH sont plus élevés. Le mode de vinification en rosé intervient-il par les additions d'anhydride sulfureux qu'il comporte ? Car il a été spécifié que ce produit ne doit être employé qu'avec modération pour ne pas compromettre la maturation du vin (12).

Le chromatogramme B sur lequel le plus grand nombre de déterminations possibles ont été réunies montre par l'image les stades de la désacidification, et figure ci-dessous. Il comporte à partir de prises de 10 mm³,

l'analyse de 15 échantillons qui groupent des vins où l'acide malique a disparu, d'autres où la transformation n'a pas eu lieu, et un seul enfin, où elle est en cours. A remarquer, ici encore, l'absence de spots d'acide tartrique pour les vins vieux nos 15 (1947) et 16 (1945).

Chromatogramme B



Les 21 vins étudiés n'ont pu être tous groupés, faute de place. Les cas intéressants figurant sur le chromatogramme B, il n' a pas été jugé utile de le faire suivre de celui des 6 autres vins qui ne présentent pas de particularités, leur fermentation étant terminée.

V. — Résumé et conclusions

Le travail qui vient d'être exposé a démontré que dans les vins à appellation « Villaudric » et « Fronton-Côtes de Fronton », il y a dans la plupart des cas disparition de l'acide malique avec production d'acide lactique.

Après avoir indiqué l'importance d'une telle étude dans les vins déjà cités, les caractères généraux de ces liquides ont été examinés ; puis l'existence de la fermentation malolactique envisagée : pour la déceler la méthode d'identification des acides organiques non volatils par chromatographie de partage sur papier, d'un emploi simple et rapide, a donné de bons résultats.

Les conclusions qui découlent de l'étude ci-dessus sont les suivantes :

— Dans les vins rouges, pour les échantillons examinés, la fermentation malolactique a lieu dans une proportion de 93.7 pour 100.

— Dans les vins rosés la transformation est moins fréquente, mais leur nombre restreint ne permet pas de généraliser les résultats.

— La rétrogradation a été pour une grande part sous la dépendance de l'acidité initiale des vins. Elle n'a eu lieu ici qu'au-dessus de pH 3. Son absence dans certains vins rosés peut être due, en outre, à l'action de l'anhydride sulfureux.

C'est ce qui sera envisagé dans une étude ultérieure qui aura trait à l'influence de différents facteurs sur le processus de la désacidification biologique.

Ce premier travail, sur l'évolution de l'acide malique dans les Vins délimités de qualité supérieure de la région de Toulouse facilitera l'orientation des recherches sur le comportement de la fermentation malolactique ; ainsi son incidence sur ces liquides sera suivie, afin de limiter certains phénomènes et d'arriver à l'obtention de vins souples et stables. Les qualités qui caractérisent ceux qui ont fait l'objet de cette note pourront être encore améliorées.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES.

(1) Ribereau-Gayon (J.). — Traité d'œnologie. Librairie Polytechnique. Ch. Béranger. Paris et Liège, p. 111.
(2) Ferre. — Indices œnologiques et rétrogradation de l'acide malique. *Ann. Fal. Fr.*, 1928, n° 230, p. 75.
(3) Lamazou-Betbeder (M.). — Observations sur la maturation du raisin et la conservation des vins de la région de Toulouse. *Bulletin d'Agriculture du Sud-Ouest*, 1953, p. 128.
(4) Ribereau-Gayon (P.). — Évaluation de l'acide malique des vins par chromatographie sur papier. *Ann. Fal. Fr.*, 1954, n° 541-42, p. 3.
(5) Mathieu-Reverdy (G.). — L'appellation d'origine Villaudric. *Bul. Agr. Sud-Ouest*, 1944, p. 253.
(6) Mathieu-Reverdy (G.). — Le vignoble et les vins des « Côtes de Fronton ». *Bul. Agr. Sud-Ouest*, 1945, p. 260.
(7) Triby. — Le type de vin de Villaudric. *Bul. Agr. Sud-Ouest*, 1944, p. 569.
(8) Dore (R.). — Etude du vin de Villaudric. Thèse Pharmacie. 1939. Toulouse.
(9) *Loc. cit.* (voir n° 4).
(10) *Loc. cit.* (voir n° 4).
(11) Charpentie (Y.). — Contribution à l'étude biochimique des facteurs de l'acidité du vin. *Ann. Tech. Agr.*, 1954, p. 89.
(12) Flanzy (M.), de Seze (R.) et Lamazou-Betbeder (M.). — Essais sur le mode d'action de certains produits œnologiques utilisés en vinification. *Rev. Vit.* 1936, t. LXXXIV, p. 5 et 21.

SUR QUELQUES ASPECTS DE L'UTILISATION DES ANTIBIOTIQUES DANS LES JUS DE FRUITS

PAR

M. ATTISSO et P. GALZY

Laboratoire de Recherches de la chaire de Technologie
de l'École Nationale d'Agriculture de Montpellier,
Centre de recherches agronomiques du Midi.

Introduction

Le problème des antiseptiques susceptibles d'inhiber le développement des levures de la fermentation dans les jus de fruits et dans les vins doux semble trouver un regain d'actualité avec les acquisitions récentes dans le domaine des antibiotiques.

Il importe de souligner au passage que toutes les nouvelles recherches, comme les très nombreux travaux anciens dont l'importance n'échappe à personne, sont dominées par le souci de mettre à la diposition de l'industriel, un produit actif à faible dose et sans effets sur la qualité des jus de fruits. En outre un tel antiseptique ne doit présenter aucune toxicité et aucun inconvénient à plus ou moins longue échéance pour l'homme, quelle que soit la quantité de jus de fruits qu'il aura pu absorber. De plus, il faut, dans les conditions idéales, un produit incolore ou à peine teinté, insipide, inodore, soluble dans les jus de fruits et relativement bon marché.

La découverte d'une telle substance est rendue malaisée par la biologie un peu spéciale des levures. Il s'agit, en effet, de micro-organismes, dont la vitalité peut supporter des variations de pH de 2,5 à 8,5. Cette vitalité, quelque peu déconcertante, traduit l'importance de l'équipement enzymatique qui rend les adaptations et les mutations faciles. Tous ces faits expliquent le grand nombre de travaux consacrés à ce problème capital de l'économie agricole.

Il conviendrait en outre que l'antibiotique utilisé assure une bonne protection contre un développement de moisissures, éventualité qui n'est pas à négliger dans les jus de fruits.

Le but de cette mise au point est simplement d'exposer dans une 1re partie le résultat des travaux poursuivis dans le domaine des antibiotiques, et dans une 2e partie de signaler leurs conséquences à plus ou moins longue échéance sur l'organisme humain.

I. — Étude du point de vue technologique

Le domaine des antibiotiques semble actuellement très étudié en vue d'une recherche des utilisations en technologie.

Bien que la notion d'antagonisme biologique entre les levures et certaines substances sécrétées par divers micro-organismes remonte aux travaux de PASTEUR, c'est avec la découverte des antibiotiques que cette notion s'est précisée et a pris une forme concrète. Les expériences entreprises alors pour déterminer le spectre bactérien des antibiotiques ont révélé l'existence de trois types parmi ces derniers :

1° ceux qui sont uniquement actifs sur les bactéries ;

2° ceux dont l'activité s'étend à la fois aux bactéries et aux champignons ;

3° ceux qui sont spécifiquement fongicides ou fongistatiques.

Nous passons sous silence l'ensemble des travaux qui ont conduit à cette classification et qui sont intimement liés à la genèse même des antibiotiques. Nous rappellerons simplement, parmi les recherches à incidence strictement technologique, les importantes études de : DARPOUX et FAIVRE-AMIOT (1), celles de AISO KASUYOSCHI (2), celles de FLANZY et DUPUY (3), et celles de PEYNAUD et LAFOURCADE (4).

Nous avons repris cette étude avec les antibiotiques que l'on peut se procurer actuellement en France. Nous avons utilisé les deux techniques classiques suivantes :

1° Détermination de la sensibilité des levures aux divers antibiotiques suivant une méthode des disques sur milieu solide en boîte de Petri. Le commerce ne livrant pas de disques de sensibilité pour tous les antibiotiques, nous avons été amenés à les préparer nous-même.

Les disques se préparent en saturant une rondelle de papier filtre de 1 cm de diamètre à l'aide d'une solution d'antibiotiques à 1 mmg/cc.

La technique d'utilisation est la suivante :

— couler un milieu de culture gélose dans une boîte de Petri et laisser prendre en masse ;

— ensemencer à l'aide d'un cc de culture de 24 heures sur moût ; bien répartir sur toute la surface du milieu de culture et rejeter l'excès de liquide après une heure de contact ;

— placer les disques d'antibiotiques.

Au bout de trois jours, la zone d'inhibition autour du disque est mesurée.

2° Étude de la fermentation du moût en présence d'antibiotiques dans les conditions naturelles.

Nous avons ensemencé d'une façon très modérée, du jus de raisin avec une culture jeune de levures en présence de quantité croissante de

chacun des antibiotiques, puis nous avons noté les dates de départ en fermentation.

Nous avons également opéré avec un ensemencement massif en levure (10^4 cellules par cc) pour nous placer dans les conditions les plus défavorables.

Deux souches de *Saccharomyces cerevisiae, var. ellipsoideus* nous ont permis d'expérimenter avec les antibiotiques suivants :

— pénicilline,
— streptomycine et dihydrostreptomycine,
— auréomycine,
— terramycine et tétracycline,
— chloramphénicol,
— néomycine,
— magnamycine,
— bacitracine,
— actinomycine,
— framycétine,
— polymyxine,
— érythrocine,
— patuline,
— tyrothrycine.

Voici les résultats que nous avons obtenus :

1° AVEC LA MÉTHODE DES DISQUES, nous avons pu apprécier le développement des levures sur milieu solide en présence des antibiotiques.

Le tableau suivant résume nos observations quant au pouvoir inhibiteur des antibiotiques sur le développement des souches utilisées.

Zone d'inhibition ..... en mm	Terramicine 1	Penicilline 2
Zone d'inhibition ..... en mm	Auréomycine 6	Streptomycine 1
Zone d'inhibition ..... en mm	Chloram phénicol 4	Polymyxine 2
Zone d'inhibition ..... en mm	Magnamycine 2	Erythrocine 2
Zone d'inhibition ..... en mm	Néomycine 3	Thyrotricine 4

En comparant ces zones avec les données classiques de la méthode, nous remarquons que les diamètres sont pour la plupart situés dans la zone de résistance ; cependant certains antibiotiques tels l'auréomycine, le chloramphénicol et la thyrotricine ayant un diamètre d'inhibition plus grand, présentent une légère activité.

Dans ces conditions, on peut admettre que les souches étudiées résistent à la magnamycine, la néomycine et la polymixine à des doses de l'ordre de 50 mg.

Tandis que pour l'auréomycine, le chloramphénicol et la thyrotricine elles résistent à des concentrations d'environ 30 mg.

Ces observations sont analogues à celles déjà signalées par d'autres auteurs (*).

2° En nous plaçant dans les conditions normales de conservation des jus de fruits, nous avons pu constater que des doses de 200 mg par litre d'antibiotiques n'empêchent pas la fermentation mais provoquent seulement, dans les cas les plus heureux, un retard de quelques jours.

Dans le cas d'un ensemencement massif (10^4 cellules par cc) nous n'avons observé aucun retard de la fermentation.

Il apparaît donc que les antibiotiques que nous avons étudiés sont incapables d'empêcher la fermentation des jus de fruits.

La différence d'activité entre les deux méthodes d'expérimentation peut s'expliquer par la grande richesse en facteurs de croissance des jus de fruits ou par les différences de conditions de vie au point de vue aérobiose.

C'est sans doute ce qui rendra plus difficile l'application des données théoriques. Cependant, les récents travaux de Peynaud et Lafourcade semblent traduire un certain optimisme quant à l'utilisation pratique de certains antibiotiques, en particulier l'actidione, la mycosubtiline, l'antimycine A, la candicidine et la Botryticine.

L'actidione est inutilisable pour la conservation des jus de fruits car elle n'a pas une action suffisamment énergique sur certaines espèces de levures telles que *Kloeckera apiculata*. Par contre, elle paraît utilisable pour la conservation des vins doux.

Son emploi comme celui de tous les antibiotiques, soulève cependant un certain nombre d'objections générales, que nous étudierons plus loin.

L'antimycine A serait aussi plus intéressante pour la conservation des vins doux que pour celle des jus de fruits : si sa destruction par le suc gastrique est effectivement totale sans donner naissance à des produits toxiques, elle échapperait dans une certaine mesure aux plus graves inconvénients des antibiotiques.

La mycosubtiline demande des doses d'utilisation déjà trop élevées (5 mg par litre dans les moûts, 4 mg pour les vins doux). Il en est de même de la Candicidine.

Quant à la Botryticine mise en évidence par Peynaud et S. Lafourcade, les données qui la concernent sont encore insuffisantes pour en déduire des probabilités d'utilisation.

(*) Ce travail était en cours lorsqu'a été publié le mémoire de Peynaud et de Mlle Lafourcade (9) qui nous a paru complet et précis. Leurs résultats étaient parfaitement en accord avec les nôtres. Dans ces conditions nous avons simplement donné ici, un bref résumé de nos observations.

Par contre, ces auteurs n'ont pas traité le point de vue de l'influence que pouvaient avoir les antibiotiques sur l'organisme humain. L'importance de ce problème nous a menés à faire cette mise au point.

II. — Étude du point de vue médical

D'une manière générale, l'utilisation des antibiotiques pour la conservation des jus ne saurait être encouragée, voire conseillée à cause des inconvénients d'ordre biologique et médical qu'elle risque d'entraîner.

En premier lieu, il importe de mettre en relief un éventuel retentissement des antibiotiques sur l'organisme humain. En effet, dix années de recul nous autorisent à penser que, comme toute médication active, la thérapeutique antibiotique comporte certains accidents et incidents dont la rareté n'exclut pas la gravité. Leurs manifestations sont d'ordre hématologique et digestif. L'étiologie n'est pas toujours à rechercher dans l'administration de fortes doses pendant une longue période ; souvent, c'est un simple phénomène d'idiosyncrasie au cours de la première administration, avec une sensibilisation, lors d'une reprise. L'objection qu'on pourrait faire à notre point de vue en invoquant les faibles doses absorbées par un consommateur de jus de fruits paraît donc sans valeur et sans fondement.

Les accidents sanguins (5) portent à la fois sur la qualité et sur la quantité de sang total. C'est ainsi qu'on peut noter l'installation d'une éosinophilie, conséquence d'une réaction mésenchymateuse généralisée. Bien que faible et variable avec les antibiotiques, elle est toujours fâcheuse par son incidence sur la composition sanguine et la possibilité qu'elle offre de faire croire à une parasitose. Son apparition peut s'accompagner de réactions cutanées, de fièvre et même de purpura.

Plus fréquentes sont les anémies dont le cortège clinique et les caractéristiques biologiques leur ont valu le nom d'anémies nutritionnelles.

Bien que leur mécanisme intime soit quelque peu complexe, il est établi que la carence en complexe vitaminique du type B est leur signe majeur.

Les incidents sanguins peuvent parfois prendre une forme plus grave qui est l'atteinte médullaire. L'aplasie est souvent totale, doublée quelquefois d'hémorragies cérébro-méningées. Elle peut être dissociée : dans ce cas, c'est la granulopénie et même l'agranulocytose qui s'observent. Les conséquences d'une telle manifestation sont souvent fatales à plus ou moins brève échéance.

Les accidents digestifs (6) sont dans l'ensemble plus fréquents et plus complexes dans leur pathogénie que les accidents hématologiques.

Les plus caractéristiques sont des réactions d'intolérance classique avec nausées, vomissements. On peut noter des diarrhées, une glossite, souvent associée à une stomatite et une chéilite érythémateuse ou vésiculo-papuleuse.

Ces accidents digestifs ont d'abord été imputés exclusivement à une carence vitaminique et une destruction de la flore intestinale. Il apparaît

maintenant, à la suite de très nombreuses observations éparses dans la littérature médicale, que le processus intime de tous ces accidents est lié à un déséquilibre biologique profond.

La notion de germes de sortie, les observations relatives à des moniliases consécutives à un traitement par les antibiotiques (7-8) prouvent que c'est une désorganisation de la cobiose levures-bactéries ou simplement bactéries saprophytes et bactéries pathogènes qui est la cause fondamentale des troubles digestifs et hématologiques.

De tels faits sont à redouter, car il est possible, en fonction des données actuelles, de supposer qu'une désorganisation analogue peut apparaître, même avec les antibiotiques strictement fongicides ou fongistatiques. L'équilibre pourrait être détruit en faveur des bactéries dont la vitalité serait accrue.

En dehors des accidents et incidents que nous venons d'invoquer brièvement, il est une notion dont on ne saurait négliger l'importance : il s'agit du phénomène d'accoutumance et de l'acquisition d'une certaine résistance progressive des germes vis-à-vis des antibiotiques.

Des adaptations, des mutations pourraient ainsi apparaître rapidement, la grande vitalité des levures et leur équipement enzymatique permettant une telle alternative.

Les industriels se verraient dans l'obligation d'augmenter les doses d'antibiotiques jusque-là suffisantes dans les mêmes conditions. Il est facile de prévoir les suites fâcheuses d'une telle éventualité, tant sur la qualité même des jus de fruits que sur l'équilibre de la flore intestinale du consommateur.

III. — Conclusion

En résumé, le problème d'un antiseptique idéal dans la conservation des jus de fruits reste entier. Les antibiotiques ont laissé entrevoir un avenir prometteur et optimiste d'après les premières expérimentations au laboratoire. L'application à l'échelle industrielle est une chose bien plus complexe où de multiples facteurs, tant biologiques qu'économiques, apparaissent indissolublement liés et rendent le problème difficile à résoudre. Les observations médicales inclinent à la prudence et même à l'abstention.

Un jour peut-être, nous possèderons un antibiotique utilisable, répondant aux conditions exigées : il conviendra de conserver une grande prudence et de ne généraliser son emploi qu'après une longue expérimentation.

BIBLIOGRAPHIE

(1) DARPOUX et FAIVRE-AMIOT. — *C. R. Acad. Agriculture.*, **36**, 158, 1950.
(2) AISO KASUYOSCHI. — *The journal of Antibiotics* (Japon), **4**, 1951, 357.
(3) FLANZY et DUPUY. — Essai d'application à la conservation du jus de raisin du pouvoir antiferment d'un antibiotique. *Annales de Technologie*, n° 1, p. 121, 1952.
(4) PEYNAUD et Mlle LAFOURCADE. — Etude d'antibiotiques et d'antiseptiques nouveaux actifs sur le genre Saccharomyces. *C. R. Acad. Sc.*, II, **236**, 1924, mai 1953.
(5) GOUDEMAND. — Accidents sanguins des antibiotiques. *Le sang*, n° 6, 1953.
(6-8) LHERMITTE (F.). — A propos des accidents digestifs provoqués par les antibiotiques. *Semaine des Hôpitaux*, n° 71, nov. 1953.
(7) WOODS (J. W.), MANNING (H.) et PATTERSON (C. N.). — Monilial infection complicating therapeutic use of antibiotics. *J. A. M. A.*, 145,1951.
(9) REYNAUD et Mlle LAFOURCADE. — Action de quelques antibiotiques sur les levures alcooliques. *Rev. des Fermentations*. p. 228. 1953.

(Reçu pour publication : octobre 1954)

DOSAGE DE L'ANION ORTHOPHOSPHORIQUE DANS LES VINS PAR LE PROCÉDÉ ÉLECTROPHOTOMÉTRIQUE AU BLEU PHOSPHOMOLYBDIQUE

PAR

L. DEIBNER et H. BOUZIGUES

Station Centrale de Recherches sur l'Œnologie,
la Cidrerie et les Jus de Fruits, Narbonne.

PLAN DU MÉMOIRE

Introduction.

I. — **Exposé critique des méthodes colorimétriques basées sur la formation du bleu de phosphosmolybdène.**

A) Description de quelques méthodes.
B) Application de ces méthodes au dosage du phosphore dans les vins.

II. — **Travaux personnels.**

A) Etude du procédé d'AGABALIANTZ-DOUBROVSKAYA.
B) Comparaison de la technique d'AGABALIANTZ-DOUBROVSKAYA modifiée avec celle de FISKE-SUBBAROW.
C) Recherches sur l'application du traitement oxydatif au perhydrol pour le dosage de l'ion phosphorique dans les milieux dits vins artificiels.
D) Conclusions.

III. — **Exposé de la technique recommandée pour le dosage de l'ion orthophosphorique dans les vins par la méthode électrophotométrique au bleu phosphomolybdique.**

IV. — **Conclusion.**

Bibliographie.

INTRODUCTION

Le phosphore se trouve dans les vins à l'état d'ions phosphoriques et, en plus petite quantité, sous forme d'ions glycerophosphoriques et diethylphosphoriques ce qui explique l'intérêt du dosage séparé de ces formes. A côté des méthodes gravimétriques et volumétriques, il existe des procédés colorimétriques, basés surtout sur l'utilisation du bleu de phosphomolybdène ; cette coloration se forme par réduction du phosphomolybdate.

Les variantes de cette méthode sont caractérisées surtout par la nature du réducteur employé, et, au moindre degré, par les détails du mode opératoire.

I. — EXPOSÉ CRITIQUE DES MÉTHODES COLORIMÉTRIQUES BASÉES SUR LA FORMATION DU BLEU DE PHOSPHOMOLYBDÈNE

A) DESCRIPTION DE QUELQUES MÉTHODES

Le dosage du phosphore au moyen du bleu de phosphomolybdène. obtenu par réduction du phosphomolybdate, a été utilisé pour la première fois en 1887 par Osmond (1).

Ce savant a remarqué que les acides phospho, arsénio, silico-molybdiques se dissolvent dans une solution chlorhydrique de chlorure stanneux en donnant une coloration bleue dont l'intensité est proportionnelle à la quantité de composé molybdique à doser.

En 1911 Passerini (2) a appliqué cette réaction dans la chimie agricole. Wrangell (3) l'utilisa pour les recherches des phosphates dans les sols. Denigès (4) en 1920 a décrit la réaction d'Osmond en utilisant le même réducteur.

Fiske et Subbarow (5) ont utilisés comme réducteur, l'acide 1, 2, 4 aminonaphtolsulfonique.

Denigès, après avoir isolé le phosphoconjugué céruléomolybdique sous forme cristallisée (6a), a proposé une technique de dosage du phosphore utilisant une solution sulfomolybdique réduite par le cuivre (6b).

Arrhenius préfère l'emploi de l'hydroquinone comme agent réducteur ; toutefois, la priorité de l'emploi de cette substance doit probablement être attribuée à Bell et Doisy (7).

ZINZADZE (8) emploie un réactif au bleu de molybdène, c'est-à-dire à l'acide molybdique réduit à l'aide de molybdène.

FERRARI préconise le sulfate d'hydrazine à chaud (9), tandis que NAPOLI (10) fait appel à la diméthylparaphénylènediamine. La sensibilité de la réaction, ainsi que la stabilité de la coloration bleue, dépendent du choix du réducteur et des conditions qui président à la formation du bleu phosphomolybdique. Nous devons à FERRARI l'étude concernant les propriétés de ce dernier (11).

Les réducteurs suivants ont été étudiés : chlorure stanneux, réactif de FISKE-SUBBAROW, acide ascorbique et sulfate d'hydrazine. Toutes ces substances produisent des bleus de phosphomolybdène différents. D'autre part, l'acide phosphomolybdique existe, en solution aqueuse, sous deux formes : incolore et colorée en jaune. L'équilibre entre ces formes dépend de l'acidité sulfurique du milieu et de la température. Il est intéressant de noter que les bleus de phosphomolybdène sont plus résistants vis-à-vis de l'acide sulfurique que le complexe phosphomolybdique. L'obtention d'un bleu phosphomolybdique utilisable pour les déterminations spectrophotométriques est conditionnée par la réduction de la forme colorée de l'acide phosphomolybdique. En général, on obtient le mélange des deux bleus phosphomolybdiques produits par deux formes de l'acide phosphomolybdique.

FERRARI a constaté que le réactif de FISKE-SUBBAROW, l'acide ascorbique et le sulfate d'hydrazine sont plus efficaces à chaud qu'à la température ordinaire. Le choix de cet auteur a été porté sur le sulfate d'hydrazine susceptible d'agir uniquement sur la forme colorée de l'acide phosphomolybdique.

Citons encore la méthode de SUMNER (12) utilisant le sulfate ferreux comme agent réducteur ; comme on le sait, ce réactif est peu stable.

B) APPLICATION DE CES MÉTHODES AU DOSAGE DU PHOSPHORE DANS LES VINS

Les méthodes décrites précédemment ont été appliquées pour le dosage de l'ion orthophosphorique, total et minéral, dans les vins. DENIGÈS (13) a mis au point le procédé, basé sur la méthode colorimétrique visuelle par série d'étalons en lumière blanche.

NAPOLI (op. cit. (10)) a décrit une méthode de dosage électrophotométrique utilisant la diméthylparaphénylènediamine comme réducteur.

AGABALIANTZ et DOUBROVSKAYA (14) ont fait appel à la méthode de BELL-DOISY et d'ARRHENIUS et au colorimètre de DUBOSQ.

VON DER HEIDE et HENNIG (15) emploient le procédé de ZINZADZE.

La méthode d'OSMOND a été utilisée par SALVAREZZA (16). DE ALMEIDA (17) a perfectionné l'emploi de la méthode de DENIGÈS en remplaçant le bloc de WALPOLE par le colorimètre PULFRICH, à l'exemple de SALVAREZZA, et par l'appareil photoélectrique de LANGE.

La technique de BARINI-BANCHI (18) est basée sur l'utilisation de la méthode de FERRARI et d'un appareil électrophotocolorimétrique ; d'ailleurs, c'est une méthode directe. La détermination spectrophotométrique de l'ion orthophosphorique peut être effectuée suivant la technique de BECK et PRO (19) ; cette dernière fait appel à la méthode de FISKE-SUBBAROW et emploie les spectrophotomètres du type BECKMAN ou COLEMAN.

JOSLYN et LUKTON (20) ont utilisé la méthode de SUMMER ; les mesures photoélectriques sont faites à longueur d'onde de 660 mμ ; le phosphore organique n'est pas dosé.

Nous avons réuni dans le tableau I les caractéristiques de chaque procédé indiqué tout à l'heure.

TABLEAU I

Méthode type	Réducteur utilisé	Auteur	Application aux vins							
			Procédé colorimétrique				Détermination			
			Visuel		Photométr.		PO_4 total		PO_4 min.	
			ordinaire	instrumental	photo-électro	spectro phot.	cendres	vin traité	vin dilué	vin décoloré
Osmond-Wrangell	$SnCl_2$.	SALVAREZZA.	—	+	—	—	+	—	—	—
Denigès	Cuivre.	DENIGÈS.	+	—	—	—	+	—	+	—
Denigès	—	ALMEIDA.	—	+	+	—	+	—	+	—
Bell-Doisy -Arrhenius	Hydroquinone + sulfite.	AGABALIANTZ-DOUBROVSKAYA.	—	+	—	—	—	+	—	+
Zinzadze	Acide molybdique réduit par le molybdène	HEIDE-HENNIG	+	—	—	—	+	—	—	—
Napoli	Diméthyl-para-phénylénediamine.	NAPOLI.	—	—	+	—	+	—	—	—
Ferrari	Sulfate d'hydrazine.	BARINI-BANCHI	—	—	+	—	—	—	+	—
FISKE-SUBBAROW	Acide 1, 2, 4 amino-naphtolsulfonique.	BECK-PRO.	—	—	—	+	+	—	—	—
SUMNER	Sulfate ferreux.	JOSLYN-LUKTON.	—	—	+	—	—	—	+	—

N. B. Les croix désignent les caractéristiques des procédés.

Cette revue rapide des procédés de dosage de l'ion phosphorique dans les vins a été schématisée de manière à rendre plus compréhensible la différence existant entre les différents modes opératoires.

Il nous reste maintenant à dégager les conclusions qui s'imposent en ce qui concerne la valeur analytique de chaque procédé mentionné. La technique de SALVAREZZA a l'inconvénient d'utiliser la courbe d'étalonnage expérimentale qui ne suit pas la loi de LAMBERT-BEER.

Le procédé de DENIGÈS-ALMEIDA est sensible à la présence du fer ferrique ce qui ressort des travaux de YUEN et POLLARD (21) ; pendant la minéralisation sèche les pertes en phosphore sont sensibles comme l'a démontré ALMEIDA ; d'autre part, la détermination de l'ion phosphorique non lié avec des substances organiques est effectuée directement sur le vin dilué.

NAPOLI emploie une substance organique peu courante et d'un prix comparativement élevé. Le procédé de BARINI-BANCHI utilise le sulfate d'hydrazine pour le dosage de l'ion phosphorique sous forme minérale seulement directement dans le vin dilué.

La méthode de FISKE-SUBBAROW est sensible au fer ferrique et, par conséquent, exige un traitement spécial au bisulfite, nécessaire pour éliminer l'influence signalée (op. cit. (21)).

Par contre, la technique d'AGABALIANTZ-DOUBROVSKAYA utilise le mélange d'hydroquinone et de sulfite comme réducteur ; d'ailleurs, ces réactifs courants et d'un prix modique permettent d'éliminer l'action perturbatrice du fer ferrique ; ils sont, d'ailleurs, employés pour la réduction de ce dernier lors de son dosage à l'aide de l'orthophénanthroline.

II. — TRAVAUX PERSONNELS

La technique d'AGABALIANTZ-DOUBROVSKAYA nous a paru intéressante en raison de l'emploi du réducteur comparable dans les grandes lignes à celui utilisé pour le dosage électrophotométrique des traces de fer dans les vins (22).

En donnant notre préférence à cette technique, nous étions sûrs à priori de pouvoir éliminer l'action perturbatrice du fer ferrique, déjà signalée sur le dosage de l'ion phosphorique. Toutefois, le procédé russe fait appel à la colorimétrie visuelle, ce qui a posé le problème de sa transformation en procédé électrophotométrique. En même temps nos études ont porté sur l'influence des substances gênantes telles que le fer et les silicates solubles.

La technique ainsi modifiée a été comparée à celle de FISKE-SUBBAROW améliorée par YUEN et POLLARD (op. cit. (21)).

Ayant constaté sa supériorité, nous l'avons vérifiée sur des vins

artificiels secs et sucrés, additionnés de quantités connues et variables d'anion phosphorique.

L'application de notre procédé de traitement oxydatif au perhydrol (23) nous a montré que les liquides obtenus à partir de ces vins se prêtent sans difficulté au dosage de l'ion phosphorique total ; d'autre part, ce traitement permet d'éviter les pertes en phosphore organique habituellement constatées lors de l'emploi de la minéralisation sèche. Les recherches sur le dosage de l'ion phosphorique non combiné aux substances organiques ont fait ressortir l'avantage de l'utilisation de charbon animal convenablement purifié pour la décoloration des vins ; cette dernière est préférable à une simple dilution souvent insuffisante pour atténuer l'influence de la couleur propre aux vins.

A) ÉTUDE DU PROCÉDÉ D'AGABALIANTZ-DOUBROVSKAYA

a) Description du procédé

1° Principe

Une prise d'essai d'un vin est minéralisée à l'aide d'un mélange d'acide sulfurique et azotique ; on effectue ensuite, dans le liquide obtenu, la réduction du phosphomolybdate formé en utilisant de l'hydroquinone en présence de bisulfite alcalin.

Le bleu de molybdène phosphoré formé est évalué dans le colorimètre de Dubosq par rapport aux solutions standarisées d'un phosphate alcalin.

2° Réactifs utilisés

1° Solution type de phosphate monopotassique.

On dissout 0,3833 g de phosphate dans un litre d'eau en y ajoutant une ou deux gouttes de mélange de toluène et de chloroforme afin de protéger la solution de l'action des moisissures. 1 ml de cette solution contient 0,2 mg de P_2O_5 ou 0, 278 de PO_4^{--}.

2° Solution de molybdate d'ammonium.

On dissout 25 g dans un litre d'eau ; on conserve la solution à l'abri de la lumière.

3° Solution du réducteur.

On prépare une solution de base en dissolvant dans 100 ml d'eau 1 gramme d'hydroquinone, 15 grammes de bisulfite de sodium et 0,5 grammes de sulfite de sodium.

Avant l'emploi, on dilue la solution dans la proportion de 1 à 4. La solution de base doit être conservée dans un flacon en verre jaune.

4° Acide sulfurique dilué (9N).

On mélange un volume d'acide concentré et trois volumes d'eau.

3° Mode opératoire

α) Détermination de l'ion orthophosphorique total.

5 ml de vin sont évaporés presqu'à sec dans une fiole microkjeldahl, disposée sur une toile métallique. Ensuite on ajoute 5 ml d'un mélange contenant une partie d'acide sulfurique et une partie d'acide azotique, et on chauffe jusqu'à la décoloration.

Durant la minéralisation, on additionne, à l'aide d'une ampoule, de l'acide azotique goutte à goutte (pour les vins secs, deux, trois gouttes, davantage pour les vins sucrés).

Après la fin de la minéralisation, qui dure 10-30 minutes, on chauffe le liquide, additionné de 10-15 ml d'eau, jusqu'à complète disparition des oxydes de l'azote. Le contenu de la fiole, ainsi que les eaux de lavage, est transvasé dans une fiole jaugée de 100 ml. En même temps on mesure dans une autre fiole jaugée de 100 ml, 10 ml de solution type de phosphate monopotassique et 10 ml d'acide sulfurique dilué. Les deux fioles contiennent la même quantité d'acide. Ensuite on verse dans chaque fiole 20 ml de molybdate d'ammonium et 20 ml d'hydroquinone.

Après l'ajustage des volumes, on bouche les fioles et on exécute les mesures colorimétriques après une heure.

β) Détermination de l'ion orthophosphorique présent à l'état des phosphates minéraux.

On traite, dans une capsule en porcelaine 5 ml de vin par 1 g — 2 g de charbon animal calciné en poudre ; les vins faiblement colorés exigent une quantité moindre. On filtre dans une fiole jaugée de 100 ml, on lave le charbon avec de l'eau distillée jusqu'à l'obtention d'un volume de 40-45 ml. Ensuite, on ajoute 10 ml d'acide sulfurique dilué et on continue comme précédemment.

b) Utilisation du procédé étudié comme procédé électrophotométrique

Lorsqu'on utilise un colorimètre photoélectrique il est inutile de préparer chaque fois des solutions-type, comme c'est le cas pour la colorimétrie visuelle ; celles-ci ne sont utilisées que pour l'établissement des courbes de référence et pour des contrôles éventuels. On sait que le minimum de transmission, pour le bleu de molybdène phosphoré, formé sous l'action de l'hydroquinone est à mμ ; toutefois, on exécute les mesures à la longueur d'onde de 650 mμ. Puisque la loi de BEER est valable dans ces conditions (24), nous avons effectué les mesures photocolorimétriques à l'aide d'un filtre Wratten 70 (filtre rouge, longueur

d'onde > 650 mμ), en employant le photocolorimètre de BONÉT-MAURY (25). La courbe d'étalonnage de l'appareil en fonction des différentes teneurs en anion phosphorique est une droite.

Le tableau I donne les résultats des mesures.

TABLEAU II

Solutions PO_4^{---} mg/l	PO_4^{---} gammas/50 ml	Densité optique en degrés Vergnes, corrigée, de l'essai à blanc (cuve 10 mm)
2	10	0,8
4	20	1,6
8	40	3,2
16	80	6,65
32	160	12,7
64	320	25,9
132	640	51,6
160	800	64,9

Comme on voit, l'étalonnage a été fait à l'aide d'une gamme de concentrations en anion phosphorique s'étendant de 10 à 800 gammas, rapportées à 50 ml de solution. En effet, nous étions amenés à travailler avec ce volume en diminuant en même temps les quantités des réactifs. A cet effet, on introduit une prise d'essai de 5 ml de solution phosphatique dans un ballon jaugé de 50 ml, on y ajoute 5 ml d'acide 9 N, 10 ml de solution de molybdate d'ammonium, 10 ml de solution réductrice, ensuite on ajuste le volume.

La fiole bouchée reste à l'obscurité pendant une heure. L'acidité finale en acide sulfurique est de 0,9 N-0,96 N. L'erreur relative observable pendant les mesures est de $\pm$ 3 p. 100.

c) Influence de différents facteurs sur la stabilité du bleu de molybdène phosphoré

Nous avons étudié l'influence des différents facteurs sur la stabilité de la coloration du bleu de molybdène phosphoré tels que la durée de la réduction, la présence du fer et de la silice.

1° *Influence du fer et de la silice*

Les essais effectués ont démontré que la présence de 20 mg de fer et de 100 mg de silice, sous forme de silicate, par litre d'une solution phosphatique à 1 gramme de PO_4 par litre n'influe pas sur les résultats du dosage électrophotométrique. Nous savons que le procédé de DENIGÈS et celui de FISKE-SUBBAROW, amélioré par YUEN et POLLARD sont sensibles au fer ferrique à partir d'un mg par litre (op. cit. (21) p. 12).

2° Influence de la durée de réduction du fer

La solution utilisée contenait 1 gramme de PO_4 et 20 mg de fer ferrique par litre. Les variations de la densité optique en fonction du temps de réduction ont été observées sur une prise d'essai contenant 500 gammas de PO_4 en utilisant la cuve de 10 mm d'épaisseur utile.

Les résultats obtenus sont consignés dans le tableau III.

TABLEAU III

Temps de réduction min.	PO_4^{---} trouvé gammas/50 ml		Erreur %	
	série 1	série 2	série 1	série 2
30	480	494	— 4	— 1,2
60	490	502	— 2	+ 0,4
120	505	524	+ 1,0	+ 4,8
180	510	528	+ 2,0	+ 5,6

Comme on le voit, la coloration augmente avec le temps de réduction. Le moment le plus favorable pour l'évaluation de la densité optique se situe aux environs de 60 minutes exactement comptées à partir de l'ajustage du volume réactionnel à 50 ml.

B) COMPARAISON DE LA TECHNIQUE D'AGABALIANTZ-DOUBROVSKAYA MODIFIÉE AVEC CELLE DE FISKE-SUBBAROW AMÉLIORÉE PAR YUEN ET POLLARD.

On sait que la loi de BEER-LAMBERT s'exprime par la formule :

$$I_t = I_0 \, 10^{-klc}$$

où

I_t = intensité de lumière transmise

I_0 = intensité de lumière initiale

K = coefficient d'extinction.

l = épaisseur traversée en cm

c = concentration.

Si la concentration est exprimée en grammes par litre, K est appelé coefficient d'extinction spécifique.

Le rapport $\frac{I_0}{I_t}$ est appelé l'opacité et son logarithme porte le nom de densité optique.

$$D = \log \frac{I_0}{I_t} = Klc.$$

Pour une épaisseur traversée donnée la loi en question exprime qu'il y a une relation linéaire entre la densité optique et la concentration. Nous avons comparé les deux procédés FISKE-SUBBAROW (F. S.) et AGABALIANTZ-DOUBROVSKAYA modifié (A. D.) en utilisant le filtre Wratten 70 (filtre rouge $\lambda > 650$ mμ) et l'épaisseur utile de 10 mm.

En mesurant les densités optiques des solutions contenant de différentes quantités de l'ion phosphorique, et en calculant ensuite les valeurs du coefficient d'extinction spécifique, il est possible de caractériser la reproductibilité des mesures, caractérisant chaque technique par rapport à un appareil électrophotométrique choisi.

Les résultats des dosages sont consignés dans le tableau IV.

TABLEAU IV

Concentration PO_4^{---} g/l	$D = \log_{10} \frac{I_0}{I_t}$		K coefficient d'extinction spécifique	
	F. S.	A. D.	F. S.	A. D.
0,0002	0,00075	0,0080	37,5	40
0,0004	0,0130	0,0160	32,5	40
0,0008	0,0280	0,0320	35,0	40
0,0016	0,0680	0,0665	42,5	41,5
0,0032	0,1310	0,1270	40,9	39,7
0,0064	0,2620	0,2590	40,9	40,5
0,0128	0,5200	0,5160	40,6	40,3
0,0160	0,6490	0,6490	40,5	40,5
Moyenne	.....	.....	38,8	40,31

Il est facile de constater que les valeurs du coefficient d'extinction obtenues suivant le procédé d'AGABALIANTZ-DOUBROVSKAYA sont plus régulières, ce qui déjà démontre la supériorité de ce procédé par rapport à celui de FISKE-SUBBAROW amélioré par YUEN et POLLARD.

Pour caractériser la reproductibilité des mesures, c'est-à-dire les limites entre lesquelles une mesure pourra être considérée comme significative, nous avons fait appel au calcul statistique (26).

La somme des carrés des écarts par rapport à la moyenne de K pour chaque procédé étudié est la suivante :

pour F. S. $\Sigma \varepsilon^2 = 84,46$
pour A. D. $\Sigma \varepsilon^2 = 2,13$.

L'écart-type sur la moyenne est donné par la formule :

$$S' = \sqrt{\frac{\Sigma \varepsilon^2}{n(n-1)}}.$$

On a pour FS : S' = 1,227 et pour A. D. : S' = 0,195.

Pour le nombre des mesures égal à N = 8, le coefficient affecté à

S' est de 2,5 ; il permet de chiffrer à plus de 95 p. 100 la probabilité de trouver le chiffre exact dans les valeurs comprises entre la moyenne, diminuée de 2,5 fois l'écart-type, et la moyenne augmentée de 2,5 fois l'écart-type. La valeur vraie a 95 p. 100 de chances de se trouver à l'intérieur des limites :

Pour F. S.

$$\mu = 38{,}8 \pm 2{,}5 \times 1{,}227 = 38{,}8 \pm 3{,}07,$$

c'est-à-dire : elle oscille entre 35, 73 et 41,86.

Pour A. D.

$$\mu = 40{,}31 \pm 2{,}5 \times 0{,}195 = 40{,}31 \pm 0{,}48$$

c'est-à-dire qu'elle oscille entre 39,82 et 40,79.

La fidélité, grandeur caractéristique de la dispersion des résultats autour de la valeur moyenne, en valeur relative, sera :

Pour F. S.

$$F = \pm \frac{3{,}07 \times 100}{38{,}8} = \pm 7{,}9\ \%$$

Pour A. D.

$$F = \pm \frac{0{,}48 \times 100}{40{,}31} = \pm 1{,}2\ \%.$$

Les résultats montrent que la loi de BEER est suivie dans nos conditions, avec plus de fidélité, dans le procédé d'AGABALIANTZ-DOUBROVSKAYA modifié ce qui a déterminé notre choix définitif. En outre, nous avons tenu compte de son insensibilité au fer ferrique en raison de l'emploi du réducteur agissant à la fois sur cet élément à l'état oxydé et sur le phosphomolybdate. Dans ce qui suit, nous avons exprimenté uniquement le procédé choisi.

C) RECHERCHES SUR L'APPLICATION DU TRAITEMENT OXYDATIF AU PERHYDROL POUR LE DOSAGE DE L'ION PHOSPHORIQUE DANS LES MILIEUX DITS VINS ARTIFICIELS.

Divers essais systématiques ont été entrepris dans le but de voir si le procédé du traitement oxydatif au perhydrol, décrit par nous (op. cit. (23)), pouvait être appliqué au dosage de l'ion phosphorique. A cet effet, nous avons utilisé les vins synthétiques secs ou sucrés.

a) Composition des vins synthétiques

Nous avons préparé, à partir des produits chimiques purs, un vin artificiel suivant la recette de MARIGNAN (27).

Voici sa composition en grammes par litre :

Acide tartrique	3
— malique	3
— citrique	0,5
— lactique	2
— succinique	0,75
— acétique	0,60
— sulfurique	1
— chlorhydrique	0,50
Hydroxyde de potassium	1,50
— de sodium	0,20
Magnésie	0,50
Carbonate de calcium	0,25
Aluminium	0,010
Cuivre	0,002
Ammoniaque	0,2
Glycérine	10,0
Gomme arabique	1,0
Bisulfite de sodium	0,2
Tanin (Newmarks Grape Tannin)	3,0
Éthanol absolu	100 ml

Le pH du liquide obtenu est de 3,3.

On ajoute au vin des quantités variables de fer et d'ion phosphorique sous forme de chlorure ferrique à 1 g de fer par litre et de phosphate disodique à 41,25 g de sel à deux molécules d'eau par litre, acidulé avec 5 ml d'acide sulfurique pur (1 ml de cette solution contient 25 mg d'ion phosphorique) ; suivant les besoins on additionne également des glycérophosphates solubles, du sucre et du pyrophosphate de sodium.

b) **Traitement oxydatif**

A la suite de quelques essais d'orientation, nous avons mis au point une technique de traitement oxydatif au perhydrol, permettant de doser l'anion phosphorique dans les liquides obtenus. Voici le mode opératoire utilisé :

On introduit dans un ballon Kjeldahl de 100 ml quelques grains de pierre ponce traitée à l'acide chlorhydrique et lavée à l'eau distillée, 5 ml de vin, 5 ml d'eau, 5 ml d'eau oxygénée à 110 volumes ; le ballon est chauffé sur le banc de sable, à gaz ou électrique ; on l'enlevait au moment de l'apparition de la mousse. Au résidu liquide obtenu (environ 2 à 3 ml) on additionnait, après refroidissement, 1 ml d'ammoniaque de densité 0,9 goutte à goutte, à l'aide d'une burette, en observant les précautions données dans notre travail (op. cit. (23)). On reprenait par 50 ml d'acide sulfurique 9 N, puis par de l'eau pour avoir le volume de 100 ml. A la prise d'essai de 10 ml versée dans une fiole de 50 ml, on ajoute 10 ml de molybdate d'ammonium, 10 ml de réducteur, on complète le volume, on mélange les liquides après avoir bouché le récipient. Après l'attente de 60 minutes à l'obscurité, on exécute les mesures photocolorimétriques.

c) Dosage de l'ion phosphorique présent sous forme de phosphates

Nous avons appliqué le traitement oxydatif aux cinq vins artificiels contenant par litre 20 mg, 50 mg, 100 mg, 500 mg, et 1 000 mg d'anion phosphorique sous forme de phosphate bisodique. Le dosage électrophotométrique de l'ion en question a été effectué sur les liquides obtenus à la suite de ce traitement. Le tableau V résume les résultats obtenus.

TABLEAU V

Fer mg/litre	PO_4^{---} mg/litre	PO_4^{---} trouvé		Erreur %
		gammas dans 50 ml	mg/litre	
15	20	10	20	0
»	20	10	20	»
»	50	25	50	»
»	50	25	50	»
»	100	50	100	»
»	100	50	100	»
»	500	246	492	— 1,6
»	500	247	494	— 1,2
»	1 000	496	992	— 0,8
»	1 000	498	996	— 0,4
50	50	24,5	49	— 2,0
»	500	256	512	+ 2,4

Les résultats obtenus permettent de conclure en faveur de l'efficacité du mode opératoire utilisé, valable pour des teneurs en anion phosphorique comprises entre 20 mg et 2 g par litre.

d) Dosage de l'ion phosphorique combiné avec les cations minéraux et avec les substances organiques

1° Dosage de l'ion PO_4^{---} combiné sous forme de glycérophosphates alcalins

On sait que l'ion phosphorique existe naturellement dans les vins à l'état d'ions combinés aux cations minéraux ou aux substances organiques, sous forme d'ions glycérophosphoriques et diéthylphosphoriques. Nous avons vu précédemment que le dosage de l'ion phosphorique, présent sous forme de phosphates minéraux, s'effectue sans aucune difficulté dans les liquides obtenus, à la suite du traitement oxydatif. Il nous restait à voir si ce traitement est applicable dans le cas de glycérophosphates solubles. Les essais effectués nous ont donné des résultats satisfaisants. D'autre part, on a constaté qu'à froid et sans le traitement oxydatif l'ion phosphorique des glycérophosphates échappe au dosage;

d'ailleurs, la stabilité des glycérophosphates vis-à-vis des réactifs de l'ion phosphorique est bien connue. D'autre part, l'hydrolyse acide des substances en question est complète à chaud ; l'action de l'eau oxygénée à chaud détermine leur oxydation avec la formation d'acide formique suivant les données d'EFFRONT (28) et avec la libération de l'ion orthophosphorique.

2° Dosage de l'ion phosphorique minéral en présence de glycérophosphates

Nous avons vu précédemment qu'il est possible, d'après AGABALIANTZ et DOUBROVSKAYA, d'évaluer l'ion phosphorique minéral seul dans le vin rapidement décoloré, à froid, par le charbon animal. Signalons que SIMULEANU et GHIMINESCU (29) emploient également du charbon animal pour faciliter le même dosage dans les vins. Nous avons suivi cette technique commode en utilisant le charbon complètement débarrassé des phosphates minéraux par un traitement spécial qui sera décrit ultérieurement.

Voici le mode opératoire utilisé. 5 ml de vin sont traités dans une capsule en porcelaine par 1 gramme de charbon animal ; on filtre le liquide décoloré dans une fiole jaugée de 100 ml, on lave le charbon avec de l'eau distillée de manière à obtenir le volume de 45 ml ; on y additionne 50 ml d'acide sulfurique 9 N et on ajuste le volume. On prélève 10 ml du liquide obtenu et on continue en suivant le mode opératoiredéjà indiqué.

3° Résultats obtenus

Les essais ont été effectués sur les vins artificiels secs et sucrés.

a) Vins artificiels secs

Les vins artificiels secs contenaient du phosphate bisodique, du glycérophosphate de potassium en quantités variables ; la teneur en fer était de 10 mg par litre.

Les résultats obtenus sont consignés dans le tableau VI.

Remarquons de suite que les résultats de l'essai N° 2 représentent les moyennes des valeurs très rapprochées.

De l'examen des données analytiques on peut conclure que le dosage de l'ion phosphorique est suffisamment exact. Quant au dosage des phosphates minéraux, effectué sur le vin décoloré par le charbon animal, il pourrait être influencé par les conditions de lavage du charbon utilisé, ce qui détermine les pertes en anion. La teneur en ion phosphorique, combiné avec le glycérol, est obtenu par différence avec tous les inconvénients dus à un tel procédé indirect ; toutefois, dans l'ensemble, l'exactitude des résultats est suffisante.

TABLEAU VI

	PO_4^{--} mg/litre						Erreur p. 100		
	mis en œuvre			trouvé					
	tot.	min.	org.	tot.	min.	org.	tot.	min.	org.
1)	970	400	570	950	384	566	— 2,0	— 4,0	— 0,7
	»	»	»	944	384	560	— 2,7	— 4,0	— 1,7
2)	176	100	76	168	96	72	— 4,5	— 4,0	— 5,2
3)	600	400	200	596	398	198	— 0,7	— 0,5	— 1,0
	»	»	»	604	420	184	+ 0,7	+ 5,0	— 8,0

β) *Vins artificiels sucrés*

On a ajouté aux vins précédemment expérimentés 200 grammes de sucre par litre. Les essais effectués démontrent que la présence de sucre gêne le dosage de l'anion phosphorique total sans exercer, toutefois, l'influence perturbatrice sur le dosage de l'ion sous forme minérale. La dilution du vin constitue un bon moyen pour éliminer l'effet perturbateur du sucre, mieux que l'augmentation de la concentration du réducteur (la solution-mère diluée à 1/2 au lieu de 1/4).

En conclusion, le vin ne doit pas contenir plus de 100 grammes de sucre ; à cette concentration, le dosage de l'ion phosphorique total se fait aisément.

Les résultats obtenus sont consignés dans le tableau VII.

TABLEAU VII

Conditions des essais	PO_4^{--} mg par litre						Erreur p. 100		
	mis en œuvre			trouvé					
	tot.	min.	org.	tot.	min.	org.	tot.	min.	org.
sans dilution du vin	970	400	570	860	412	—	— 11,3	+ 3,0	—
	»	»	»	852	412	—	— 12,1	+ 3,0	—
a) sans dilution du vin ; réducteur dilué à 1/2	970	400	570	912	—	—	— 6,0	—	—
b) vin dilué à 1/2 ; réducteur dilué à 1/4.	»	»	»	960	—	—	— 1,0	—	—
	»	»	»	950	—	—	— 2,1	—	—

e) **Essais sur le dosage de l'anion pyrophosphorique après son hydrolyse**

Il a été signalé qu'en raison de la présence des complexes de fer indécomposables par l'acide chlorhydrique, les moûts et les vins nouveaux peuvent contenir de l'acide pyrophosphorique (30).

Dans ces conditions nous avons cherché à vérifier l'efficacité de notre procédé du traitement au perhydrol au point de vue de l'hydrolyse des pyrophosphates solubles.

En opérant sur 5 ml d'une solution de pyrophosphate de sodium à 1,4 g par litre (1 g d'anion phosphorique), nous avons pu doser 592 mg d'anion phosphorique dans un litre.

La même prise d'essai, contenant 7 mg de pyrophosphate ou 5 mg d'anion phosphorique, a été traitée avec de l'acide azotique à 10 p. 100 à chaud pendant 2 heures (op. cit. (26) p. 31) ; le rendement de ce traitement ne dépassait pas 57 p. 100.

Une autre prise d'essai de 5 ml, contenant 1,75 mg de pyrophosphate (1,25 mg d'anion phosphorique) était d'abord traitée par 5 ml de perhydrol et 5 ml d'acide azotique pur ; le résidu obtenu était dissous dans l'acide azotique pur ; la solution, portée à l'ébullition, était évaporée ; le traitement du nouveau résidu obtenu par l'acide sulfurique 9N, à l'ébullition, pendant deux heures, nous a permis d'obtenir finalement un rendement de 62 p. 100. Devant l'insuffisance des résultats obtenus dans le cas des solutions relativement concentrées en pyrophosphates, nous avons repris les essais sur les solutions simples pauvres en pyrophosphate, contenant 100 mg et 220 mg d'anion phosphorique par litre. Le traitement au perhydrol suivant notre procédé nous a donné un déficit de 56-60 p. 100. Dans ces conditions, nous avons abandonné ce procédé au profit de la minéralisation sèche. Les essais étaient effectués sur les vins artificiels contenant tout au plus 308 de pyrophosphate de (sodium 220 mg d'anion phosphorique) par litre. La minéralisation sèche a été effectuée de la manière suivante : on traitait la prise d'essai de 5 m de vin contenus dans un ballon Kjeldahl par 10 ml de perhydrol à chaud sur un banc de sable ; on ajoutait au résidu obtenu 5 ml d'acide azotique pur et 10 ml de perhydrol, on évaporait à sec ; le résidu était dissous dans 50 ml d'acide sulfurique ; après avoir amené le volume précédent à 100 ml, on effectuait le dosage sur une prise d'essai de 10 ml. Le vin artificiel contenait par litre 400 mg d'anion phosphorique sous forme de phosphate bisodique, 380 mg d'anion sous forme de glycérophosphate de potassium et 220 mg d'anion sous forme de pyrophosphate de sodium.

Voici les résultats obtenus.

Tableau VIII

PO_4^{---} en gammas par 50 ml		Erreur p. 100
mis en œuvre	trouvé	
500	456	— 9,0
500	456	— 9,0

Le manque de 9 p. 100 pourrait s'expliquer soit par les pertes pendant la minéralisation sèche, due à la réduction du phosphore par les substances charbonneuses, soit par l'insuffisance de l'hydrolyse du pyrophosphate. En refaisant nos essais sur un vin ne contenant que de l'anion phosphorique des phosphates minéraux et des glycérophosphates (970 mg d'anion total par litre) nous avons trouvé une erreur par défaut de 3 p. 100 La technique de minéralisation était légèrement modifiée par rapport à la précédente. On mettait en présence 5 ml de vin, 5 ml de perhydrol, et 5 ml d'acide azotique concentré ; au résidu liquide de 2-3 ml on ajoutait les mêmes volumes de réactifs, on chauffait jusqu'à siccité et décomposition des nitrates ; les cendres obtenues étaient reprises par 50 ml d'acide sulfurique 9 N en chauffant ; après refroidissement, on complétait le volume de 100 ml avec de l'eau. L'oxydation dépend de la durée de la digestion avec le perhydrol ; l'opération peut être réglée par l'intensité de la chauffe et de la rétrogradation du liquide, obtenue facilement si l'on emploie le ballon de Kjeldahl à col long.

Afin de parfaire la décomposition des pyrophosphates nous avons utilisé la technique du traitement par l'acide chlorhydrique dilué (2 vol. d'acide pour 1 vol. d'eau) indiquée par l'un de nous (31).

Deux vins synthétiques ont été utilisés pour ces essais : l'un contenait 1 g d'anion phosphorique total par litre, l'autre 100 mg. La prise d'essai de 5 ml du premier vin était traitée deux fois par 5 ml de perhydrol et 5 ml d'acide azotique concentré en ramenant chaque fois le liquide au résidu sec.

Les cendres blanches étaient dissoutes par 5 ml d'acide chlorhydrique (2 : 1) ; on lavait le ballon avec de l'acide, en employant chaque fois 5 ml, puis avec 10 ml d'eau. On évaporait à sec le liquide obtenu dans un petit bécher, disposé sur un bain-marie bouillant. Le résidu était traité par 5 ml d'acide chlorhydrique ; on ajoutait 50 ml d'acide sulfurique 9N et on ajustait le volume avec de l'eau. La prise d'essai de 10 ml contenait 500 ou 50 gammas d'anion phosphorique. Les résultats du dosage sont consignés dans le tableau IX.

TABLEAU IX

Composition du vin en PO_4^{---} mg/litre			Résultats obtenus PO_4^{---} total mg/litre		Erreur p. 100
phosphate mis	glycérophosphate	pyrophosphate	mis en œuvre	trouvé	
400	380	220	1 000	892	— 10,8
40	38	22	100	92	— 8,0

Il y a lieu de penser que dans les conditions de nos essais, l'hydrolyse du pyrophosphate reste incomplète ; d'autre part, la minéralisation

sèche peut amener les pertes en anion phosphorique par le volatilisation du phosphore. Les essais effectués avec les vins naturels ont montré que cette perte peut être sensible ; ce fait a été signalé par ALMEIDA (op. cit. (17)).

De tout ceci nous sommes amenés à conclure que notre procédé du traitement oxydatif au perhydrol n'assure pas l'hydrolyse rigoureuse de l'ion pyrophosphorique ; son dosage sous forme d'anion orthophosphorique peut être obtenu à 5 p. 100 — 8 p. 100 près, à la suite d'une minéralisation complète du vin à l'aide du perhydrol et de l'acide azotique ; l'excès de ces réactifs doit être éliminé par évaporation à sec.

D) CONCLUSIONS

Après avoir examiné en différentes méthodes colorimétriques qui ont pu être proposées pour doser l'anion orthophosphorique dans les vins et après un certain nombre d'essais, concernant particulièrement la méthode de FISKE-SUBBAROW, améliorée par YUEN et POLLARD et celle d'AGABALIANTZ-DOUBROVSKAYA, transformée par nous en procédé électrophotométrique, nous avons donné notre préférence à ce dernier pour les raisons que voici. D'une part, ce procédé fait appel, pour la formation du bleu de phosphomolybdène, aux mêmes réducteurs nécessaires pour notre technique du dosage du fer (op. cit. (22)) ; d'autre part, les résultats des dosages effectués suivant son mode opératoire, suivent des très près la loi de BEER, leur reproductibilité étant constante pour les petites et grandes teneurs en anion phosphorique.

Ensuite nous nous sommes rendu compte que l'application de notre procédé du traitement oxydatif au perhydrol ne diminue en rien, au point de vue des résultats, les avantages déjà acquis lors de son utilisation pour l'évaluation des traces de fer dans les vins. Cette identité des réactifs de réduction et des traitements constitue une simplification fort appréciable pendant l'exécution parallèle des dosages du fer et de l'ion phosphorique dans les vins.

En ce qui concerne le dosage de l'ion phosphorique dit minéral en présence des ions glycérophosphoriques, le choix du traitement au charbon animal pur nous a permis d'éliminer la technique. souvent préconisée, de la dilution du vin ; en effet, la coloration de ce dernier s'ajoute nécessairement à celle du bleu phosphomolybdique, d'où l'apparition d'une erreur difficile à chiffrer et dont l'influence, à priori variable, ne figure nullement lors de l'établissement des courbes d'étalonnage.

L'évaluation de l'ion phosphorique organique, présent dans les vins sous forme de glycérophosphates, est obtenue indirectement, par différence, entre les teneurs en ion total et en ion minéral. Malgré cet inconvénient, non négligeable au point de vue purement analytique, sa connaissance approximative est souvent fort utile.

La technique expérimentée ne nous permet pas de doser les pyrophosphates éventuellement présents dans les vins.

A la lumière de toutes ces recherches, dont nous venons de relater les conclusions, il nous est possible de décrire une technique rapide de dosage de l'ion orthophosphorique dans les vins secs et sucrés.

III. — EXPOSÉ DE LA TECHNIQUE RECOMMANDÉE POUR LE DOSAGE DE L'ION ORTHOPHOSPHORIQUE DANS LES VINS PAR LA MÉTHODE ÉLECTROPHOTOMÉTRIQUE AU BLEU PHOSPHOMOLYBDIQUE

A) PRINCIPE DE LA TECHNIQUE

Une prise d'essai de vin, diluée si sa teneur en sucre dépasse 100 g par litre, est traitée par du perhydrol. Le mélange est concentré à chaud, en présence de pierre-ponce pour accélérer la décomposition de l'oxydant. Le résidu liquide obtenu est traité à froid par la solution concentrée de l'hydrate d'ammonium ajouté en léger excès. Après la destruction de l'excès d'eau oxygénée, on additionne au liquide limpide, l'acide sulfurique 9N. Une partie aliquote de cette solution est additionnée d'une solution de molybdate d'ammonium et d'une solution réductrice (hydroquinone + sulfite). L'intensité de la coloration bleue, due à la formation du bleu de molybdène phosphoré, est mesurée à l'aide d'un électrophotocolorimètre. On obtient ainsi la teneur en anion total. L'évaluation de l'ion phosphorique minéral s'effectue directement sur une prise d'essai décoloré à froid par le charbon animal. L'anion phosphorique en combinaison avec le glycérol est déterminé par différence.

B) MODE OPÉRATOIRE

Le mode opératoire comprend deux techniques : l'une concerne le dosage de l'ion orthophosphorique total et l'autre est relative au dosage de l'ion présent sous forme de phosphates minéraux.

a) Dosage de l'ion orthophosphorique total

Ce dosage se décompose en deux parti:es

1° traitement oxydatif au perhydrol ;

2° dosage de l'électrophotométrique du bleu de phosphomolybdène formé.

1° Traitement oxydatif au perhydrol

α) *Réactifs nécessaires* :

— Eau oxygénée pure à 110 volumes.

— Pierre-ponce en grains, traitée par l'acide chlorhydrique et lavée avec de l'eau distillée.

— Hydrate d'ammonium pur, densité 0,9.

— Acide sulfurique 9N (1 vol. d'acide concentré pour 3 vol. d'eau).

β) *Protocole opératoire.*

Pour les vins secs ou modérément sucrés, jusqu'à 100 g de sucre par litre, contenant de 20 mg à 2 g d'anion phosphorique par litre, la technique est la suivante.

On introduit dans le ballon de Kjeldahl de 100 ml de capacité quelques grains de pierre-ponce, 5 ml de vin, 5 ml d'eau oxygénée ; on concentre le liquide au bain de sable jusqu'à un volume de 2 à 3 ml ; le ballon doit être légèrement incliné, ce qui est obtenu en posant la partie supérieure de son col sur une baguette de verre d'un gros diamètre, fixée en position horizontale.

Après refroidissement on ajoute dans le résidu obtenu, goutte à goutte, 1 ml d'hydrate d'ammonium à l'aide d'une burette jusqu'au léger excès perceptible à l'odeur.

On trouvera tous les détails opératoires dans notre travail précédent (op. cit. (23)). Après refroidissement, le liquide, légèrement alcalin, est additionné de 50 ml d'acide sulfurique 9N ; ensuite on transvase la solution obtenue dans un ballon jaugé de 100 ml. Après le lavage du ballon de Kjeldahl avec de l'eau, on complète le volume dans la fiole jaugée au trait à l'aide de l'eau.

Les vins contenant plus de 100 g de sucre par litre doivent être dilués pour en avoir 100 g au maximum. On aura soin d'effectuer les essais à blanc constitués par l'eau distillée en remplacement du vin.

2° Formation de phosphomolybdate, sa réduction ; formation du bleu de phosphomolybdène

α) *Réactifs nécessaires* :

— *Molybdate d'ammonium.* — Dissoudre 25 g de sel dans un litre. Conserver à l'abri de la lumière.

— *Réducteur.* — Dissoudre 1 g d'hydroquinone, 15 g de bisulfite de sodium, et 0,5 g de sulfite de sodium dans 100 ml d'eau. Conserver la solution dans un flacon jaune. Pour l'usage, diluer dans la proportion de 1 à 4.

— *Préparation du bisulfite de sodium* (32). — Traiter un volume de bisulfite de sodium pur par un volume égal d'alcool à 96° ; essorer à l'entonnoir de BUCHNER ; le rendement est de 80 p. 100 -90 p. 100.

β) *Protocole opératoire.*

On prélève sur le volume obtenu de 100 ml, à l'aide d'une pipette de précision, 10 ml dans une fiole jaugée de 50 ml ; on y ajoute 10 ml de solution de molybdate d'ammonium et 10 ml de réducteur ; on ajuste le volume ; on laisse la fiole bouchée à l'abri de l'air pendant 1 heure.

3° **Mesures électrophotocolorimétriques**

α) *Etalonnage de l'électrophotocolorimètre.*

L'appareil utilisé par nous est un photocolorimètre de BONÉT-MAURY. On emploie le filtre Wratten n° 70 (longueur d'onde > 650 mμ). Actuellement, l'alimentation de notre appareil s'effectue à l'aide d'un transformateur-redresseur alimenté par le courant de 110 stabilisé ; l'étalonnage de l'appareil est fait à l'aide d'une gamme de concentrations d'anion phosphorique, rapportées à 50 ml de solutions, s'étendant de 10 à 800 gammas ; la cuve utilisée à 10 mm d'épaisseur utile. La solution étalon est une solution de phosphate bisodique (Na_2HPO_4, $2H_2O$; marque R. A. L.), contenant 1 gramme d'anion phosphorique par litre ; on ajoute 2,5 ml d'acide sulfurique concentré par litre, avant l'ajustage du volume (l'acidité est de 0,0925 N).

β) *Mesures et calcul des résultats.*

Pour effectuer la mesure de la densité optique d'une solution inconnue on utilise la cuve de 10 mm d'épaisseur ; on retranche de la densité optique trouvée la valeur de la densité optique lue pour un essai à blanc exécuté dans les mêmes conditions. En connaissant la densité optique corrigée, il est facile de calculer la teneur en anion phosphorique par litre de vin se rapportant à la courbe d'étalonnage. Notre courbe est dressée de telle façon qu'aux densités optiques lues correspondent des nombres de gammas d'anion contenus dans un volume de 50 ml de l'essai soumis aux mesures colorimétriques. Comme on le sait, ce volume contient 10 ml du liquide acide prélevé sur 100 ml d'une solution acide obtenue après le traitement oxydatif de 5 ml de vin. En appelant n, le nombre de gammas d'anion phosphorique, contenus dans 50 ml de la solution examinée et correspondant à 0,5 ml de vin, nous calculons la teneur en anion PO_4 suivant la relation :

$$2n = \text{mg } PO_4/\text{litre}$$

Pour exprimer les résultats en P_2O_5 il suffit de multiplier par le coefficient 0,747 (33).

$$PO_4 \times 0{,}747 = P_2O_5$$

b) Dosage de l'ion phosphorique présent sous forme de phosphates minéraux

1° Réactifs nécessaires :

— *Charbon animal.* Nous employons le charbon animal Merck. Ce produit commercial contient des phosphates minéraux. Pour le purifier, il est indispensable de le traiter dans un ballon, muni d'un réfrigérant ascendant, avec de l'acide chlorhydrique à l'ébullition, puis avec de l'eau distillée à l'ébullition.

Le charbon, ne donnant plus la réaction des phosphates, est lavé avec de l'eau sur un entonnoir de BUCHNER ; on le sèche. Son activation est faite dans un creuset fermé, disposé dans un petit four électrique à creuset (Prolabo n° 3327). Le charbon ainsi activé est conservé dans un flacon bouché à l'émeri. Le traitement thermique doit être renouvelé de temps à autre (Cf. op. cit. (32) p. 363).

— *Acide sulfurique 9N.* On ajoute trois volumes d'eau à un volume d'acide concentré.

2° Protocole opératoire

On traite dans une capsule en porcelaine 5 ml de vin par 1 g-2 g de charbon. On filtre dans une fiole jaugée de 100 ml et on lave le charbon avec de l'eau distillée jusqu'à l'obtention d'un volume de 40 ml-45 ml, on ajoute 50 ml d'acide sulfurique 9*N*, on complète le volume avec de l'eau distillée. On y prélève 10 ml, on les verse dans une fiole jaugée de 50 ml et on continue suivant le mode opératoire indiqué pour le dosage de l'ion phosphorique total.

c) Évaluation indirecte de l'ion phosphorique contenu dans les esters organiques

La teneur en anion phosphorique faisant partie des composés organiques tels que les glycérophosphates, le diéthylphosphate, s'obtient par différence, en retranchant de la teneur en anion total celle de l'anion minéral, contenu dans les phosphates minéraux.

Quoique assez répandue (op. 34) cette évaluation indirecte est souvent imparfaite comme nous le verrons tout à l'heure ; en effet, cette détermination accumule les erreurs commises lors du dosage de l'ion phosphorique total et minéral.

C) FIDÉLITÉ DES RÉSULTATS

La fidélité de nos résultats se situe entre ± 1 p. 100 et 5 p. 100. Lors des mesures à l'aide d'un photocolorimètre commercial, muni de filtres et de deux cellules photoélectriques, l'écart minimum entre deux lectures de la densité optique peut être évalué à 0,2 en degrés Vergnes

(un degré Vergnes étant égal à 0,01 de la densité optique) ; cette valeur correspond à 3 gammas d'anion phosphorique contenu dans le volume de 50 ml de liquide soumis aux mesures ou à 6 mg par litre ; en effet, le coefficient de transformation est égal à 2 000. Toutefois, l'écart admissible entre deux lectures correspondant à deux échantillons identiques, est compris pratiquement entre 0,2-0,4 en degré Vergnes. Pour les faibles teneurs en anion phosphorique, 20 mg par litre, par exemple, il est nécessaire d'avoir 25 gammas dans le volume 50 ml, soumis aux mesures, ce qui est facilement obtenu par l'augmentation de la prise d'essai, prélevée sur le volume de 100 ml de solution acide, obtenue après le traitement oxydatif ; il est facile d'en prélever 30 ml au lieu de 10 ml habituels. Evidemment, il faut tenir compte de cette augmentation du volume pendant les calculs des résultats. Notre technique permet de doser des teneurs en anion orthophosphorique jusqu'à 2 grammes par litre, pour une prise d'essai de 5 ml de vin. Toutes ces considérations sont valables pour le dosage de l'ion phosphorique total et minéral. Quant aux teneurs en anion phosphorique faisant partie des substances organiques, elles sont obtenues par calcul comme différence entre les deux premières formes. Il est évident que la fidélité des résultats de tels calculs dépend des erreurs commises lors de l'évaluation de l'ion total et minéral : le tableau X donne un exemple fort instructif. Les essais comportaient l'addition au vin, dont les teneurs en différentes formes de l'ion phosphorique étaient préalablement déterminées, des quantités connues de l'ion phosphorique minéral et organique, sous forme d'un phosphate minéral et d'un glycérophosphate.

TABLEAU X

Vin rouge — Saint-Nazaire (Aude)

PO_4^{--} en mg/litre									Erreur p. 100		
naturellement présent			ajouté			trouvé					
tot.	min.	org.	tot.	min.	org.	tot.	min.	org.	tot.	min.	org.
236	192	44	352	200	152	552	414	138	— 6,1	+ 5,5	— 28,6
»	»	»	»	»	»	552	412	140	— 6,1	+ 5,1	— 29,6

Comme on le voit, l'erreur relative commise sur l'anion total était négative et celle concernant l'anion minéral était positive ; en définitive l'erreur sur le calcul de l'ion combiné dans les substances organiques est fort importante. Evidemment, c'est un cas exceptionnel ; d'une façon générale, la détermination de l'ion organique comporterait à priori des écarts sensibles par rapport à la réalité.

D) APPLICATION DU PROCÉDÉ PROPOSÉ AUX VINS NATURELS

Les dosages de l'ion phosphorique, selon la technique décrite, dans quelques vins naturels, ont fourni les résultats consignés dans le tableau XI.

TABLEAU XI

Prise d'essai : 5 ml

Nature du vin	Résultats en PO_4^{--} mg/litre		
	total	minéral	organique
Vins rouges			
Villeneuve (Aude)	300	207	93
Saint-Nazaire (Aude)	236	192	44
Vins rosés			
Lézignan (Aude)	240	240	—
Vins blancs			
Grenache sec Truchan (Aude)	85	55	30
Clairette St-Jean de la Blaquière (Hérault)	300	246	54
Vins doux naturels			
Blanc vieux Estagel (P.-O.)	13,25	13,0	—
» » » »	14,0	13,1	0,9

IV. — CONCLUSION

Le dosage électrophotométrique de l'ion phosphorique dans les vins a été pratiqué par des différents chercheurs. Nous avons cru utile d'apporter notre contribution à l'étude de ce dosage envisagé sous l'angle de son interdépendance vis-à-vis de celui du fer. En effet, il est utile de connaître les concentrations de ces deux éléments en raison de leur rôle respectif pendant les précipitations ferriphosphatiques.

L'évaluation colorimétrique du fer, suivant notre procédé, étant basée sur la formation de l'orthophénanthroline ferreuse à partir du fer ferrique réduit par le mélange d'hydroquinone et de sulfite, nous avons cherché à faire appel à une méthode de dosage de l'ion phosphorique utilisant les mêmes réactifs pour la réduction du phosphomolybdate en bleu de molybdène phosphoré. Le procédé colorimétrique visuel d'AGABALIANTZ-DOUBROVSKAYA, dérivant de la méthode d'ARRHENIUS, nous a permis, après l'étude sur son adaptation électrophotométrique, d'atteindre le but recherché.

En même temps, le traitement oxydatif au perhydrol, expérimenté auparavant sur les vins en vue de faciliter le dosage du fer, cité tout à l'heure, a pu être également appliqué avec succès au dosage de l'ion phosphorique dans les liquides en question.

Les recherches effectuées nous ont permis d'établir une technique de dosage de l'ion phosphorique dans les vins en la ramenant au maximum de simplicité. Cette technique a été justifiée par des séries de déterminations sur les vins artificiels. Grâce aux conditions de vérification analytique rigoureuse et rationnelle, il nous est possible d'affirmer que la technique proposée donne le moyen de doser correctement l'ion orthophosphorique, total et minéral, dans de bonnes conditions de rapidité et d'exactitude.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

(1) Osmond (F.). — Réaction pouvant servir au dosage colorimétrique du phosphore dans les fontes et les acides. *Bull. Soc. Chim. Fr.*, **47**, 738, 1887.

(2) Passerini (N.). — *Gazz. Chim. Ital.*, **41**, 182, 1911 (d'après Lange (B.) ; Analyse colorimétrique, 1947, 251, Paris-Liège, Dunod-Desoer éd.).

(3) Von Wrangell (M.). — *Landw. Jahrbuch*, **63**, 669, 1926 (d'après Lange (B.) ; Analyse colorimétrique, 1947, 251, Paris-Liège, Dunod-Desoer éd.).

(4) Denigès (G.). — Réaction de coloration extrem. sensible des phosphates et des arséniates ; les applications, *C. R. Ac. Sc. Fr.*, **171**, 802, 1920.

(5) Fiske (C.) et Subbarow (Y.). — *J. Biol. Chem.*, **66**, 375, 1925.

(6) Denigès (G.). — *a*) Préparation et composition des phospho et arsénioconjugués céruléomolybdiques cristallisés. *C. R. Ac. Sc. Fr.*, **184**, 687, 1927. *b*) Microdosage immédiat de l'ion phosphorique par céruléomolybdimétrie dans les liquides de l'organisme, les eaux naturelles, les boissons fermentées, les matières agr. etc. *C. R. Ac. Sc. Fr.*, **186**, 313, 1928.

(7 *a*) Bell (R.) et Doisy (E.). — *J. Biol. Chem.*, 1920, **44**, 55 (d'après Snell (F.), Snell (C.). Colorimétrie Methods of Analysis, 1949, **2**, 666, New-York, Van Nostrand C° édit.).

(7 *b*) Arrhenius (O.). — Pflanzenernährung, Düngung und Bodenkunde, Teil A, **14**, 135, 1929.

(8) Zinzadze (S.). — Neue Methoden zur colorim. Bestimmung des Phosphor- und Arsensäure. *Z. f. Pflanzenernährung, Düngung und Bodenkunde*, **16**, 129, 1930.

(9) Ferrari (C.). — *Mem. Accad. Sci. Inst. Bologna* (9), **3**, 57, 1935-1936.

(10) Napoli (L.). — Dosage colorimétrique de l'anhydride phosphorique dans les substances alimentaires au moyen d'un colorimètre photoélectrique. *Ann. Chim. Applicata*, **27**, n° 5, 258, 1937 (d'après Ch. et Ind. **39**, n°. 6, 1189, 1938, *Ann. Ch. Anal.* (2), **20**, 184, 1938).

(11) Ferrari (C.). — Contributo alla conoscenza del bleu di molibdeno fosforato. *Gazz. Chim. Ital.*, **81**, 795, 1951.

(12) Sumner (J.). — A method of the colorim. determination of phosphores. *Science*, **100**, 413, 1944.

(13) Denigès (G.). — Microdosage extemporané de l'ion phosphorique dans les vins et autres boissons fermentées. *Ann. Fals. Fraudes.*, **21**, 136, 1928, *Bull. Off. Int. Vin.*, déc., **61**, 1928.

(14) Agaballiantz (G.) et Doubrovskaya. — Semimicrométhode colorimétrique du dosage de l'ion phosphorique dans les vins. *Rec. Trav. Labor. Œnochimique du Don*, S. S. S. R. 85, 1931 (d'après Frolov-Bagreev (A.), Agaballiantz (G.). *Chimie du Vin*, 1951, 368, Moscou, Pischepromizdat édit.).

(15) Von der Heide (C.) et Hennig (K.). — Bestimmung des Arsens, und der Phosphorsäure, des Kupfers, Zinks, Eisen und Mangans in Most und Wein. *Z. f. Untersuchung der Lebensmittel*, **66**, 341, 1933.

(16) SALVAREZZA (M.). — Microdeterminazione del fosforo nei mosti et nei vini col fotometro di Pulfrich. *Ann. Reg. Staz. Enol. Sperim. Asti*, (2), **2**, 49, 1935-1937.
(17) DE ALMEIDA (H.). — Doseamento microquïmico do acido fosforico do Vinho do Porto, *Anais Inst. Vinho Porto*, 1942.
(18) BARINI-BANCHI (G.). — Determinazione dir. del fosfore nei vini per via colorimetrica, *XXII Congrès Ch. Ind.* Milan 1950 (d'après Ch. et Ind., **64**, n° 3 *bis*, 1950).
(19) BECK (J.) et PRO (M.). — Report on spectrophot. determ. of phosphates in wines. *J. Assoc. Off. Agr. Chem.* U. S. A., **35**, n° 2, 257, 1952.
(20) JOSLYN (M.) et LUKTON (A.). — Prevention of Copper and Iron Turbidities in wine *Hilgardia* U. S. A., **22**, n° 14, 481, 1953.
(21) YUEN (S.) et POLLARD (A.). — The Fiske-Subbarow Method for determining phosphate with special reference to soil extracts. *J. Sc. Food. Agr.*, **2**, n° 1, 36, 1951.
(22) DEIBNER (L.) et BOUZIGUES (H.). — Dosage électrophotométrique de traces de fer total dans les vins à l'aide de l'orthophénanthroline. *Ann. Tech. Agr.*, I. N. R. A., **1**, n° 3, 282, 1952.
(23) DEIBNER (L.) et BOUZIGUES (H.). — Procédé rapide de traitement oxydatif des vins secs ou sucrés par voie humide à l'aide du peroxyde d'hydrogène ; son application au dosage électrophotométrique de traces de fer à l'aide de l'orthophénanthroline. *Ann. Tech. Agr.*, I. N. R. A., **4**, n° 4, 301, 1953.
(24) SNELL (F.) et SNELL (C.). — Colorimétric methods of analyses, 1949, **2**, 666. New-York, Van Nostrand C° éd.
(25) BONÉT-MAURY. — *C. R. Sc. Biol.*, **135**, 197, 1941.
(26) CHARLOT (G.) et BEZIER (D.). — Méthodes modernes d'analyse quant. min. 1949, 652. Paris, Masson édit.
(27) MARIGNAN (R.). — Le dosage de l'acide succinique dans les vins. Thèse Pharmacie, Montpellier, 1944, 112.
(28) EFFRONT (Y.). — Action de l'eau oxygénée sur la glycérine. *Bull. Soc. Chim. Fr.* (4), **11**, 744, 1912.
(29) SUMULEANU (C.) et GHIMICESCU (G.). — Une nouvelle microméthode colorimétrique pour le dosage des phosphates dans les vins. *Bull. Office Int. Vin*, n° 108, mai, 19, 1937.
(30) RIBÉREAU-GAYON (J.). — Traité d'œnologie, 1947, 435, Paris-Liège, Béranger édit.
(31) DEIBNER (L.). — Microdosage iodométrique du fer dans les vins et les jus de raisin. Thèse Montpellier 1949, *Ann. Agr.*, n° 6, 343, 1949. *Bull. Soc. Chim.*, **15**, 1125, 1948, *Mikrochemie-Microchim. Acta*, **35**, n°4, 488, 1950.
(32) BELOZERSKY (A.) et PROSCOURIAKOV (N.). — Manuel des travaux pratiques de la biochimie des plantes 1951, 363, Moscou, Science Soviétique éd.
(33) KÜSTER (F.). — Logarithmische Rechentafeln für Chemiker, 1947, 81, Berlin, W. de Gruyter Verlag.
(34) VOGT (E.). — *Weinchemie und Weinanalyse*, 1953, 246, Stuttgart, Ulmer Verlag.

Tout récemment, GEORGEAKOPOULOS (G.) et Mlle KOURAKOU (V.) ont mis au point une méthode de dosage du phosphore total dans les vins (Dosage colorimétrique du phosphore total dans les moûts et les vins, *Chim. Chronika*, Grèce, **19**, n° 1-2, 1, 1954) comprenant l'emploi du traitement sulfopermanganique et la réduction du complexe phosphomolybdique par p-méthylaminophénolsulfate. En outre, Mlle V. KOURAKOU préconise la séparation de l'ion phosphorique minéral sous forme du phosphate de baryum (Dosage colorim. du phosphore min. dans les vins ; *Chim. Chronika*, **20**, 7, 1955). Également PRO (A.) a publié un mémoire sur le dosage spectrophotométrique des phosphates dans les vins et les eaux-de-vie (Report on spectrophotom. determination of phosphates in wines and spirits, *J. Ass. Off. Agr. Chem.*, U. S. A., **37**, n°3, 663, 1954). Nous avons appris l'existence de ces travaux trop tardivement pour les citer dans le texte, déjà rédigé, de notre mémoire.

INFLUENCE DES TRAITEMENTS PAR RADIATIONS INFRA-ROUGES SUR LES CONSTITUANTS GLUCIDIQUES DES CHATAIGNES

PAR

J. MOLLARD (1)

Station de Technologie Végétale, Versailles

PLAN DU MÉMOIRE

I. — **Introduction.**

II. — **Essais effectués.**

III. — **Méthodes d'analyse.**

a) Dosage des sucres solubles à l'eau.
b) Dosage de l'amidon.
c) Pertes d'humidité après traitement.

IV. — **Résultats.**

1° Au cours du traitement.
2° Au cours de la conservation.
3° Interprétation des résultats.

V. — **Conclusion.**

I. — INTRODUCTION

Divers modes de traitement ont été proposés pour lutter contre les insectes prédateurs des châtaignes : les balanins (Balaninus éléphas) et les Carpocapses (Laspereysia Splendana) et éventuellement contre les champignons (pourritures : noire et brune). A son éclosion, la larve incluse dans le fruit s'y développe aux dépens des constituants et après en avoir détruit une part importante, parfois même la totalité, elle sort du fruit en perçant les enveloppes et s'implante en terre.

L'impossibilité d'empêcher, avec les moyens de lutte actuels, l'in-

(1) Avec la collaboration de Melles I. J. ARISHOLM et J. AKSNES.

festation à la floraison, a orienté les recherches vers les procédés de traitement curatifs dont le but est de tuer la larve par des moyens physiques ou chimiques, avant qu'elle ait pu détruire une partie importante du fruit qui la contient et de détruire les spores de champignons.

L'efficacité de tels traitements est fonction de nombreux facteurs, tels que la résistance des larves des insectes et des spores de champignons aux divers agents physiques ou chimiques, l'état d'hydratation des fruits, leur taille, etc.

Pour tenir compte de ces éléments, certaines conditions de traitement doivent être fixées. Ces conditions, impératives pour l'efficacité de l'opération, permettent-elles de conserver intacte l'intégrité du fruit ?

Nous avons essayé de donner une réponse à cette question en montrant quelles incidences pouvaient avoir les divers traitements envisagés sur certaines qualités des fruits.

Après l'étude de l'influence des traitements par fumigation au $BrCH_3$ (1) et par courants à haute fréquence (2), nous exposons ici nos conclusions relatives au traitement des châtaignes par radiations infra-rouges.

II. — ESSAIS EFFECTUÉS

Ce mode de traitement vise à porter le fruit à une température suffisamment élevée pour tuer les larves qu'éventuellement il contient.

Les essais ont été effectués avec le four à radiations infra-rouges construit à la Station de physiologie acoustique de Jouy-en-Josas (3).

Les châtaignes disposées en couche mince sur un tapis roulant, circulent entre 2 plans horizontaux de chauffage. A leur sortie du four, les fruits traversent une chambre d'étuvage avant d'être recueillis en bout de chaîne. La ventilation de l'air dans l'appareil peut-être assurée par un système prévu à cet effet.

Au cours des différents essais, nous avons fait varier la température maximum atteinte par les fruits traités de 41° à 66°5, la température léthale pour les larves de balanins et carpocapses étant de l'ordre de 50-55°. L'évolution de la température au cœur du fruit est contrôlée par un thermocouple depuis l'entrée dans l'appareil jusqu'à la sortie.

La durée de traversée du four proprement dit a varié de 32 à 75 secondes, mais la température maximum au cœur du fruit est atteinte après environ 5 minutes au cours du chambrage.

La chute de température succédant à ce maximum est assez lente, une baisse de 10° se produit en 15 minutes environ.

Nous nous sommes attachés à voir quelles modifications pouvaient provoquer ces traitements thermiques sur l'humidité et sur les constituants glucidiques du fruit.

III. — MÉTHODES D'ANALYSE

a) **Sucres solubles à l'eau** : ils sont extraits par macérations de farine de châtaignes dans l'eau froide. Après filtration et défécation, la solution subit une inversion forte à l'acide chlorhydrique selon la méthode de Von FELLENBERG (4). Le sucre inverti est dosé d'après la méthode BERTRAND.

b) **Amidon** : nous exprimons l'amidon total par la différence entre les glucides totaux et les sucres solubles à l'eau. Nous dosons les glucides totaux en opérant une hydrolyse diastasique avec l'extrait de malt sur des macérations de farine de châtaigne préalablement bouillies. La température d'hydrolyse est fixée à 57°. Nous contrôlons la fin de l'hydrolyse avec l'iode : une goutte de solution ajoutée à une goutte d'iode N/1 000 ne doit pas provoquer de trace d'une coloration nouvelle. Pour tenir compte des glucides apportés par le malt, un essai à blanc doit être fait.

Sur les solutions filtrées et déféquées, nous faisons une inversion forte (méthode de Von FELLENBERG) et dosons le sucre inverti formé par la méthode BERTRAND.

Nous avons également fait des hydrolyses partielles de l'amidon, ceci nous permettant de voir si les amidons des châtaignes traitées étaient sensibles de façon semblable à une hydrolyse ménagée.

Nous opérons dans les mêmes conditions que précédemment, mais au lieu de faire une hydrolyse complète à 57°, nous élevons graduellement la température des échantillons soumis à l'hydrolyse diastasique de 45 à 63° pendant 1 heure. Par différence du résultat trouvé avec les sucres solubles à l'eau, nous obtenons une fraction de l'amidon total que nous nommerons *amidon labile*.

c) **Perte d'humidité après traitement** : les différents lots sont placés dans des conditions identiques à l'air libre au laboratoire et nous avons contrôlé, par pesée des échantillons, les pertes de poids observées durant plusieurs jours suivant immédiatement le traitement.

IV. — RÉSULTATS

Les pertes d'humidité constatées au bout de 3 jours peuvent être de 10 p. 100 supérieures chez les châtaignes traitées que chez les non traitées ; cette différence entre châtaignes traitées et non traitées restait ensuite stable. Elle a été d'autant plus faible que les châtaignes ont été moins chauffées lors du traitement.

Les résultats des analyses de glucides faites immédiatement après traitement en janvier, et après 2 mois de conservation, en mars, sont consignés dans le tableau I. On constate :

1° **Au cours du traitement** : une faible augmentation de la teneur en sucres solubles à l'eau pour les échantillons traités à 58°5 et 59°, cette augmentation étant très marquée pour l'échantillon traité à 66°5.

L'augmentation de la teneur en amidon labile déjà marquée pour le lot traité à 50° avec ventilation, devient important de 56°5 à 59°. Pour le lot n° 7, la teneur en amidon labile est semblable à celle du lot témoin alors que la teneur en sucre inverti est bien plus élevée. Ce résultat semble être l'aboutissement de l'évolution constatée dans les précédents échantillons : l'élévation progressive de température produirait tout d'abord une légère hydrolyse de l'amidon, puis l'amidon labile ainsi formé serait activement transformé en sucres plus simples.

2° **Au cours de la conservation** : comme phénomène général nous observons une augmentation de la teneur en sucres solubles à l'eau, dosés comme sucre inverti.

La température de 50° semble être une température critique de traitement. Les châtaignes non traitées ou traitées à une température allant jusqu'à 50° (sans ventilation) présentent des caractères communs : la teneur en sucre inverti augmente fortement et la teneur en amidon labile aussi ; (le fruit transforme, en les utilisant, ses réserves glucidiques).

Dans les lots traités de 50° (avec ventilation) jusqu'à 66°5, on constate une augmentation de la teneur en sucres solubles à l'eau semblable à celle des lots précédents, sauf pour le numéro 7 où cette augmentation est faible.

Par contre la teneur en amidon labile diminue, cette diminution pouvant atteindre jusqu'à 50 p. 100. Il semblerait donc qu'il y ait une perte en éléments glucidiques pour les châtaignes traitées à plus de 50°. Ceci est confirmé par le dosage de l'amidon total sur les lots après 2 mois de conservation. Cette évolution semblerait résulter de la série de phénomènes suivants : au cours des différents traitements portant la température des châtaignes à plus de 50°, une part importante de l'amidon est sensibilisée. Au cours de la conservation, la châtaigne dégradant cet amidon labile le transforme en sucres solubles à l'eau qui ne seraient pas stockés mais brûlés.

Signalons enfin l'importance de la ventilation dans la zone critique de traitement, soit vers 50°.

3° **Interprétation des résultats** : les modifications observées au cours

de nos analyses résultaient-elles de l'action directe de la chaleur sur les glucides ou bien d'une action indirecte par activation d'un mécanisme diastasique ?

Nous avons soumis des solutions contenant de 1 à 3 p. 100 d'amidon de riz à différentes températures allant de 50 à 80° pendant 15 minutes. Les analyses ont montré qu'il n'y avait aucune différence significative entre les divers échantillons.

L'hypothèse d'activation diastasique demanderait, pour être vérifiée, un travail approfondi. Pour dissocier le facteur action directe de la chaleur de l'action diastasique, il faudrait inhiber cette action diastasique. Ceci rencontre de sérieuses difficultés, l'inhibiteur devant être un produit capable de pénétrer à l'intérieur des châtaignes, sans action sur les glucides, ne provoquant ou ne facilitant aucune altération chimique ou microbiologique. L'hypothèse de dénaturation de la diastase par la chaleur est également difficile à envisager : d'une part l'élévation de température doit être très brusque, d'autre part la chaleur modifie la structure chimique (protéique en particulier) du fruit.

TABLEAU I

Échantillons	Température maximum	Sucre inverti g % matières sèches (janvier)	Sucre inverti g % matières sèches (mars)	Amidon labile g % matières sèches (janvier)	Amidon labile g % matières sèches (mars)	Amidon total g % matières sèches (mars)
8	Temp. Amb.	17,9	26,9	22,7	27,1	40,2
1	41°	17,5	28,7	16,1	21,2	36,9
2	47°5	18,3	29,9	16,2	22,5	33,5
3	Sans ventil. 50°	19,4	27,0	20,1	23,8	34,2
5	50°	19,4	28,3	25,2	24,4	31,4
y	56°5	18,6		36,4		36,4
6	57°	17,4	26,0	34,8	22,6	31,1
4	Sans ventil. 58°5	20,4	27,4	35,8	17,9	32,2
v	59°	21,5		33,3		33,3
7	66°5	26,4	29,0	23,8	11,4	30,5

V. — CONCLUSION

Le procédé de traitement aux radiations infra-rouges exerce une influence certaine sur l'humidité des fruits d'une part, et leur constitution glucidique d'autre part. Outre ces conditions technologiques, pour envisager une application pratique généralisée de ce mode de traitement, il faudrait également tenir compte des considérations d'ordre technique et d'ordre économique.

En effet, un traitement pour être retenu dans la pratique, doit pouvoir être appliqué sur la quantité de châtaignes récoltées chaque jour et à un rythme correspondant à celui de la récolte. C'est dire d'une part, qu'il faudrait envisager un équipement important et dont l'utilisation serait limitée à une durée très courte : celle de la récolte — d'autre part, cette étude met en évidence une certaine altération du fruit par traitement thermique aux infra-rouges.

Dans l'attente de l'établissement de méthodes de lutte sur l'arbre pour supprimer l'infestation du fruit, but idéal à atteindre, nous pensons que les recherches de traitements curatifs doivent être orientées vers des solutions plus simples et plus économiques.

BIBLIOGRAPHIE

(1) Coulon (J.), Mollard (J.), Barret (A.), Viel (G.). — Rétention de Brome par les châtaignes traitées au Bromure de méthyle. *Phytiatrie-Phytopharmacie*, **2**, 63-69, 1954.

(2) Martouret (D.), Mollard (J.). — Haute fréquence et désinfection des grains et des denrées. *Phytiatrie-Phytopharmacie*, **3**, 99-105, 1954.

(3) Busnel (R. G.), Darpoux (H.) et Ridet (M.). — Utilisation de la chaleur transmise par le rayonnement infra-rouge comme méthode de désinfection des châtaignes contre les spores d'Endothia. *C. R. Acad. Agric.*, **513**, 1951.

(4) Von Fellenberg (Th.). — Trennung der Zuckerarten. *Mitt. Lebensm. Unters. Hyg.*, **38**, 265-291, 1947.

Le Directeur-Gérant : B. Laclavière.

Imprimerie Bussière à Saint-Amand (Cher), France. — 26-8-1955.
Dépôt légal: 3e trimestre 1955 *N° d'impression: 814*

ÉTUDE SUR LA DESTRUCTION DES MICROBES ET LA DÉNATURATION DES PROTÉINES DU LAIT PAR UN CHAUFFAGE AU-DESSUS DE 100° C

PAR

J. HERMIER et G. MOCQUOT

Station centrale de Microbiologie et Recherches laitières
Jouy-en-Josas

PLAN DU MÉMOIRE

I. — **Introduction.**

II. — **Technique des essais et méthodes d'examen des échantillons au laboratoire.**

A. — Technique des essais.
B. — Méthodes d'examen des échantillons au laboratoire.

III. — **Résultats.**

A. — Influence de la température de chauffage sur la destruction des germes microbiens.
B. — Dosage des composés azotés du lait cru et du lait chauffé.

IV. — **Discussion.**

Résumé.

Bibliographie.

I. — INTRODUCTION

La préparation, par un procédé de chauffage convenable, d'un lait stérilisé de bonne qualité doit satisfaire à deux conditions opposées :

— destruction des germes microbiens que renferme le lait cru ;

— altération aussi réduite que possible des constituants et des qualités organoleptiques du lait stérilisé.

La zone utile des températures et durées de chauffage, à l'intérieur de laquelle un effet thermique suffisant mais non excessif permet de concilier ces exigences contradictoires, est étroite et doit être déterminée avec le maximum de précision pour chaque type d'appareil.

Il est nécessaire, en particulier, de bien étudier l'allure de la destruction des microbes au moment où l'on approche de la zone de stérilité, de manière à pouvoir définir la limite à partir de laquelle un résultat acceptable au point de vue bactériologique est atteint : il faut employer pour cela des appareils à réglage précis, permettant de reproduire exactement les mêmes conditions de chauffage d'un essai à l'autre. Lorsqu'on procède au chauffage du lait en autoclave fixe, la relation entre l'action thermique exercée et l'effet bactéricide obtenu est difficile à définir parce que les conditions de température et de durée de chauffage à l'intérieur de récipients immobiles ne sont pas suffisamment reproductibles (1). Par contre il est plus facile d'appliquer un chauffage gradué et mesurable avec les appareils continus dans lesquels la température maxima atteinte par le lait pendant son passage dans l'appareil peut être réglée avec une meilleure précision (± 0°5). On peut également, avec ces appareils, modifier le réglage de la température en cours d'opération, de manière à faire supporter au même lait des effets thermiques différents.

L'étendue de la zone utile, définie plus haut, dépend d'ailleurs également de la qualité bactériologique du lait, tout au moins de la teneur de ce dernier en germes thermo-résistants : RIDGWAY (2) a montré récemment que si l'on part de deux échantillons de lait cru, dont l'un contient un nombre de sporulés triple de l'autre, on trouve, après des chauffages de plus en plus poussés, un nombre de germes survivant de plus en plus faible mais le rapport des nombres de survivants présents dans chacun des deux échantillons reste identique au rapport initial (3/1).

La stérilisation d'un lait contenant beaucoup de germes thermo-résistants demandera, par conséquent, un chauffage plus poussé que celle d'un lait contenant un nombre plus faible de ces microbes.

On sait d'autre part que le chauffage entraîne une altération des constituants et des qualités organoleptiques du lait. Parmi les constituants dont on peut étudier les modifications figurent la globuline et l'albumine qui sont dénaturées par la chaleur : c'est ainsi que ROWLAND (3) précipite l'albumine et la globuline par chauffage du lait au bain-marie à 95° pendant 20 à 30 minutes. Il est donc intéressant de vérifier si le même résultat est obtenu ou non au cours d'un chauffage à une température supérieure à 100°, maintenue pendant un temps court.

Dans le présent travail nous avons cherché à mettre au point un ensemble de tests bactériologiques et chimiques permettant de situer la zone de fonctionnement efficace d'un appareil de stérilisation du lait. Bien que les essais formant l'objet de notre exposé n'aient porté que sur un seul modèle d'appareil, les épreuves que nous suggérons nous paraissent constituer un moyen d'étude des divers types de stérilisateurs continus et soulignent en même temps les difficultés techniques rencontrées dans ce genre de recherches.

II. — TECHNIQUE DES ESSAIS ET MÉTHODES D'EXAMEN DES ÉCHANTILLONS AU LABORATOIRE

A) TECHNIQUE DES ESSAIS

a) Principe de l'appareil

Le type d'appareil [1] dont nous nous sommes servis repose sur le principe suivant : le lait, préalablement porté à 80° dans un échangeur de température, est injecté dans un caisson rempli de vapeur saturée sous une pression et par conséquent à une température déterminées (marge de variation possible comprise entre 110° et 140°). Après avoir été porté en un temps très court — de l'ordre d'une fraction de seconde — à la température maxima de chauffage, le lait est ensuite détendu sous vide dans un deuxième caisson, où il est ramené à sa température d'entrée dans le premier caisson (80°). Il est enfin refroidi vers 10° dans un second échangeur de température.

b) Mode d'utilisation de l'appareil

Avant l'admission du lait, un chauffage à la vapeur à 140° pendant 10 minutes a pour but d'assurer la stérilité totale de l'appareil, circuits de préchauffage et de réfrigération compris.

Après mélange dans un seul bac d'une quantité de lait cru suffisante pour alimenter l'appareil pendant toute la durée des opérations, le lait est dirigé vers le stérilisateur réglé à la température de fonctionnement la plus haute (140°). En effet, cette température est celle qui doit permettre d'obtenir la destruction la plus poussée des microbes : il convient par conséquent de ne pas introduire de « contamination » dans les parties situées en aval du point de chauffage maximum, comme cela pourrait se produire si l'on commençait par fonctionner aux températures plus basses.

Le prélèvement des échantillons à 140° une fois terminé, l'appareil est réglé aux températures inférieures (120° puis 110°) et pour chacune de ces températures on effectue de nouvelles séries de prélèvements.

c) Prélèvements

Les prélèvements sont effectués :

— *pour le lait cru,* à la sortie du bac de mélange avant l'entrée dans l'appareil ;

[1] Appareil construit par les Établissements Laguilharre à Courbevoie (Seine).

— *pour le lait ayant subi le chauffage*, à la sortie du circuit de réfrigération (température 10°) au moyen d'un robinet stérilisé avant l'essai et flambé avant chaque prélèvement, toutes les manipulations étant effectuées avec le maximum de précautions d'asepsie. Le lait est reçu dans des récipients stériles, tubes ou flacons, permettant de recueillir soit 30, soit 125 ml de liquide ; les prélèvements ont lieu à des intervalles de temps réguliers aussi rapprochés que possible pour permettre de disposer d'un nombre suffisant d'échantillons et l'on donne à chaque tube ou flacon un numéro indiquant l'ordre dans lequel il a été prélevé.

Enfin on prélève aussi des échantillons de lait « chaud », à la sortie du caisson dans lequel le lait atteint la température maxima : ces derniers échantillons sont refroidis immédiatement par immersion dans l'eau glacée. Leur volume est seulement de 30ml car le prélèvement de quantités plus grandes de lait à cette température n'est guère possible sans entraîner une modification trop importante de la vitesse de refroidissement comparée à celle subie par le lait qui traverse l'appareil.

B) MÉTHODES D'EXAMEN DES ÉCHANTILLONS AU LABORATOIRE

a) Examen bactériologique des échantillons de lait cru

Sur ces échantillons sont effectuées les épreuves suivantes :
— numération des germes totaux ;
— durée de réduction du bleu de méthylène ;
— épreuve de Weinzirl (5 tubes contenant chacun 5 ml de lait).

b) Examen bactériologique des échantillons de lait ayant subi le chauffage

1. — Incubation préalable

La méthode choisie est inspirée de celle proposée par Mossel et Drion (4) pour le contrôle des lots de bouteilles ou de boîtes de lait stérilisé.

Le nombre relativement faible de germes microbiens survivant au chauffage ne peut faire l'objet d'une estimation directe par ensemencement sur gélose : il faut d'abord incuber le lait à une température convenable. Cette méthode comporte d'ailleurs, comme toutes les méthodes d'enrichissement, le risque de mettre en évidence une flore microbienne dont la composition diffère de celle de la flore primitive avant incubation.

Les échantillons de lait chauffé sont donc placés à 30° (± 0°5) pendant 20 jours et leur examen à intervalles réguliers, une fois par 24 heures, per-

met de noter pour chacun d'eux le moment où une altération du lait (floculation de la caséine) devient visible.

Ce pointde floculation nous a paru important à observer car c'est lui qui attire le premier l'attention du consommateur : le nombre de germes présents et le degré d'altération des divers constituants du lait au moment de la floculation « visible » sont probablement assez variables d'un lait à l'autre mais le test apporte cependant un moyen pratique de diagnostic dont la valeur n'est pas négligeable.

L'apparition de flocons avec exsudation d'un sérum clair et la formation d'un dépôt au fond du récipient sont le plus souvent faciles à déceler. Cependant, le rassemblement d'une couche de graisse à la partie supérieure du liquide gêne les observations quand le sérum et le dépôt n'apparaissent que lentement : on laisse alors l'échantillon à l'étuve pendant 24 heures supplémentaires et ce délai suffit en général pour que l'altération puisse être constatée sans ambiguïté.

2. — **Examen au microscope et ensemencement sur les milieux de culture**

Les échantillons visiblement altérés au cours de l'incubation sont examinés au microscope (frottis coloré au bleu de méthylène) et ensemencés sur gélose nutritive.

Les échantillons ne présentant pas d'altération visible sont examinés d'après la méthode proposée par Mossel et Drion (4) :

— ensemencement en triple de 1 ml de lait sur milieu gélosé en aérobiose (tryptone 0,5 p. 100, extrait de levure 0,25 p. 100, amidon soluble 0,1 p. 100, glucose 0,1 p. 100, gélose 1,5 p. 100, pH 7,0) et incubation à 30° suivie de la numération des colonies ;

— ensemencement dans les mêmes conditions, mais en anaérobiose, sur le milieu préconisé par Hirsch et Grinsted (5) : (extrait de levure 0,3 p. 100, peptone 1,0 p. 100, extrait de viande 1,0 p. 100, glucose 0,5 p. 100, acétate de sodium 0,5 p. 100, cystéine 0,05 p. 100, amidon soluble 0,1 p. 100, gélose 0,8 p. 100, pH 7,6).

Pour permettre un examen facile des colonies sans être gêné par l'opacité du milieu après l'addition de 1 ml de lait, le milieu de Hirsch est coulé entre le couvercle et le fond d'une boîte de Pétri suivant la technique de Marino (6).

Tout échantillon pour lequel une boîte présente plus de 7 colonies ou l'ensemble des 3 boîtes, plus de 15 colonies, est considéré comme non stérile.

3. — **Tests mesurant la stabilité du lait ou son degré d'altération**

Il nous a paru intéressant d'appliquer au lait stérilisé les épreuves rapides utilisées couramment pour le lait cru, afin de voir si elles étaient

susceptibles d'apporter une indication comparable aux résultats de l'analyse bactériologique.

D'autre part, beaucoup de germes sporulés — aérobies ou anaérobies — ayant une action protéolytique marquée, celle-ci se traduit par une augmentation de la fraction azotée non protéique du lait : la teneur en azote non protéique, après incubation, mesure donc indirectement le développement éventuel de ces germes. C'est pourquoi nous avons inclus la détermination de l'azote non protéique dans la liste de nos épreuves.

Les techniques utilisées ont été les suivantes :

— MESURE DU pH à l'électrode de verre ;

— TEST A L'ALCOOL : présence ou absence de coagulation après mélange à volumes égaux de lait et d'alcool à 68°, additionné de pourpre de bromocrésol (7) ;

— TEST DE L'ÉBULLITION : présence ou absence de coagulation après maintien 5 minutes au bain-marie bouillant ;

— TENEUR EN AZOTE NON PROTÉIQUE : un volume de lait (10 ml) est additionné de 4 volumes d'acide trichloracétique à 15 p. 100 (ROWLAND (8)). Après centrifugation (20 minutes à 5 000 tours/minute), le surnageant est siphonné en ayant soin de ne pas entraîner les particules de précipité flottant à la surface et on détermine sa teneur en azote (KJELDAHL) ou bien on mesure l'absorption en ultra-violet à 280 mμ au spectrophotomètre Beckman DU.

c) Dosage des constituants azotés du lait cru et du lait chauffé

Les différentes fractions azotées du lait (cru et chauffé) sont séparées par la méthode de ROWLAND (8) et leur teneur en azote déterminée (KJELDAHL et titrage dans l'acide borique par l'acide chlorhydrique N/20).

III. — RÉSULTATS

A) INFLUENCE DE LA TEMPÉRATURE DE CHAUFFAGE SUR LA DESTRUCTION DES GERMES MICROBIENS

a) Lait cru

La numération sur gélose et le test au bleu de méthylène (tableau I) montrent que le lait cru possède une teneur en microbes très élevée (150 à 200 millions de germes par ml). Le test de WEINZIRL est partout positif. L'acidité titrable atteint 0,19 p. 100 en acide lactique.

TABLEAU I

Lait cru

Date et n° des échantillons	Nombre de germes par ml de lait	Bactéries Coliformes par ml de lait	Durée de réduction du bleu de méthylène	Test de Weinzirl
12-7-54 1.....	150 millions	100 000	10 minutes	+++++
2.....	180 »	150 000	10 »	
4.....	200 »	150 000	10 »	+++++
13-7-54 1.....	200 »	150 000	10 »	++
2.....	200 »	150 000	10 »	++
3.....	200 »	150 000	10 »	++
8-9-54		100 000	10 »	+++++

b) Durée de conservation et stérilité des échantillons prélevés à la sortie de l'appareil

Le tableau II donne les résultats obtenus lors d'un essai préliminaire (13-7-54) sur une première série d'échantillons : on voit que l'altération « visible » a été relativement rapide (72 heures à 120°).

TABLEAU II

Résultats de l'épreuve d'incubation à 30° (durée 8 jours)
(Essai du 13.7.54)

Température de chauffage	Nombre total des échantillons	Nombre d'échantillons non altérés	Durée moyenne de conservation des échantillons
110°	10	0	36 heures
120°	8	0	72 heures
140°	8	4	60 heures (1)

(1) Ce chiffre a été calculé en tenant compte seulement des 4 échantillons qui se sont altérés; les 4 échantillons non altérés n'entrent pas dans la moyenne.

Le tableau III qui rassemble les résultats concernant une seconde série d'échantillons (8-9-54), fait ressortir entre les échantillons de cette série, une augmentation de la durée de conservation parallèle à l'élévation de la température de chauffage du lait.

A 110° la majorité des échantillons est altérée au 3e jour d'incubation à 30°.

A 120° 5 échantillons sont intacts après les 20 jours d'incubation, mais la plupart des échantillons se sont altérés au 13e et 14e jour d'incubation.

A 140° sauf une exception, tous les échantillons sont intacts — i. e. sans altération visible — à la fin des 20 jours d'incubation.

L'augmentation de l'effet bactéricide sous l'influence d'une élévation

Tableau III

Résultats de l'épreuve d'incubation à 30°

(Essai du 8. 9. 54)

Température de chauffage du lait	Nature des échantillons	Nombre total d'échantillons	Nombre d'échantillons non altérés																			
Nombre de jours d'incubation à 30°			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
110°	Flacon de 125 ml	15	15	15	1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	Tubes de 30 ml de lait prélevé froid	9	9	9	3	3	3	2	2	2	1	1	1	1	—	—	—	—	—	—	—	—
	Tubes de 30 ml de lait prélevé chaud	11	11	11	8	8	7	4	4	2	1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
120°	Flacons de 125 ml	14	14	14	14	14	14	14	12	11	11	11	11	11	8	6	6	6	6	6	6	5
	Tubes de 30 ml de lait prélevé froid	9	9	9	9	9	8	8	8	8	8	8	8	8	5	1	1	1	1	1	1	—
	Tubes de 30 ml de lait prélevé chaud	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	10	10	10	6	3	3	2	1	1	1	—
140°	Flacons de 125 ml	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15
	Tubes de 30 ml de lait prélevé froid	9	9	9	9	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8
	Tubes de 30 ml de lait prélevé chaud	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8

de la température est bien visible sur le tableau IV qui donne les durées moyennes de conservation pour chaque température. Pour permettre le calcul de cette moyenne on a admis arbitrairement, pour les échantillons non altérés visiblement à la fin de la période d'incubation, une durée de conservation de 20 jours.

TABLEAU IV

Durée moyenne de conservation à 30°, en jours, des échantillons de lait (Essai du 8.9.54)

Nature des échantillons	Température de chauffage		
	110°	120°	140°
Flacons de 125 ml	2	14	20
Tubes de 30 ml de lait prélevé froid	3	12	18
Tubes de 30 ml de lait prélevé chaud	5	13	20

Le tableau V permet de comparer les pourcentages des échantillons non altérés après incubation et ceux des échantillons stériles.

TABLEAU V

Proportion d'échantillons non altérés visiblement et d'échantillons stériles à la fin de la période d'incubation (Essai du 8.9.54)

Température de chauffage du lait	Nature des échantillons	Nombre total d'échantillons	Nombre d'échantillons non altérés	Nombre d'échantillons stériles	Pourcentage d'échantillons non altérés	Pourcentage d'échantillons stériles
110°	Flacons de 125 cc	15	0	0	0	0
	Tubes de 30 cc lait prélevé froid	11	0	0	0	0
	Tubes de 30 cc lait prélevé chaud	9	0	0	0	0
120°	Flacons de 125 cc	14	5	0	36	0
	Tubes de 30 cc lait prélevé froid	9	0	0	0	0
	Tubes de 30 cc lait prélevé chaud.	11	0	0	0	0
140°	Flacons de 125 cc	15	15	11	100	73
	Tubes de 30 cc lait prélevé froid	9	8	4	89	44
	Tubes de 30 cc lait prélevé chaud	8	8	7	100	87

A 110° tous les échantillons se sont altérés pendant l'incubation.

A 120° l'ensemencement des 5 échantillons non altérés après incubation révèle qu'ils ne sont pas stériles (tableau VII).

A 140° 44 à 87 p. 100 des échantillons sont stériles. La stérilité n'apparaît donc que pour cette température de chauffage.

c) **Flore microbienne des échantillons non stériles** (tableaux VI et VII)

Si à 110° et 120° les échantillons ne renferment que des sporulés, à 140° les sporulés sont peu fréquents : un cas de sporulés aérobies (échantillon n° 30), 2 cas de sporulés anaérobies (échantillons n° 17 et 20).

TABLEAU VI

Flore microbienne des échantillons
(Essai du 8.9.54)

	Température de chauffage du lait	Nombre d'échantillons			
		Microbes sporulés	Microcoques	Échantillons stériles	Total
Échantillons altérés visiblement	110°	35	—	—	35
	120°	29	—	—	29
	140°	1	—	—	1
Échantillons non altérés visiblement	110°	—	—	—	—
	120°	5	—	—	5
	140°	3	6	22	31

Par contre, pour 6 échantillons on observe sur les boîtes de Pétri la présence de Microcoques (Staphylocoques non pathogènes,) le nombre de ces germes variant de 100 000 à 300 000 par ml de lait après les 20 jours d'incubation à 30°. Ces Microcoques soumis ultérieurement à une pasteurisation de laboratoire (63° pendant 30 minutes) ont été détruits.

Les tests rapides mesurant la stabilité du lait (pH, alcool, ébullition) prouvent que 4 des échantillons à 120° (n° 16, 17, 28, 32) sont fortement altérés.

Par contre les échantillons à 140° qui sont stériles présentent pour les 3 mêmes tests les caractéristiques suivantes :

— pH compris entre 6,39 et 6,48 ;
— test à l'alcool négatif ;
— pas de coagulation à l'ébullition.

Sur le tableau VII on peut voir que 5 sur 9 des échantillons non stériles (n° 8, 16, 18, 30, 33) présentent à ce point de vue les mêmes caractéristiques que les échantillons stériles.

Alors qu'à 120° la teneur en azote non protéique a plus que doublé, à 140° l'augmentation est plus faible. Il est intéressant de noter que cette augmentation reste parfaitement mesurable par absorption à l'U. V. à 280 mμ (échantillons n° 16 et 20) ce qui donne un moyen rapide de la déceler au laboratoire.

TABLEAU VII. — *Examen des échantillons non altérés visiblement après incubation, mais reconnus non stériles par ensemencement sur milieux gélosés.*

(Essai du 8.9.54)

Température de chauffage du lait	Nature des échantillons	N° d'ordre de prélèvement	Ébullition (1)	Test à l'alcool (1)	pH	Germes Aérobies (1)	Germes Anaérobies (1)	N non protéique (Kjeldahl) (2)	N non protéique (U. V.) (3)
120°	Flacon de 125 ml	15	—	gris +	6,49	+ B	+ B		
	—	16	+	bleu ++	6,56	+ B	—		
	—	17	+	jaune +++	5,61	+ B	+ B		
	—	28	+	gris +	6,35	+ B	+ B	0,88	0,173
	—	32	+	gris +	6,37	+ B	+ B	0,83	
140°	—	16	—	gris —	6,49	+ M	—	0,40	0,059
	—	20	—	gris —	6,35	—	+ B	0,41	0,074
	—	25	—	gris —	6,32	+ M	—	0,405	
	—	33	—	gris —	6,42	+ M	—		
	—	8	—	gris —	6,44	+ M	—		
	Tubes de lait prélevés froids	18	—	gris —	6,44	+ M	—		
	—	26	—	bleu —	6,58	+ M	—		
	—	30	—	gris —	6,43	+ B	—		
	Tubes de lait prélevés chauds	17	+	gris —	6,49	—	+ B gaz	0,43	
140°	Échantillons stériles		—	gris —	6,39 à 6,48	—	—	0,39	0,000

(1) : — pas de coagulation à l'ébullition, pas de précipitation au test à l'alcool, pas d'aérobies, pas d'anaérobies. + : coagulation à l'ébullition, précipitation très fine au test à l'alcool, présence de germes aérobies, présence de germes anaérobies sporulés. ++ : précipitation nette. +++ : précipitation très forte. B : Bacilles sporulés. M : Microcoques (Staphylocoques non pathogènes). (2) : en mg d'azote par ‰ de lait. — (3) : absorption à 280 mμ. Le zéro de l'appareil étant réglé arbitrairement sur la valeur trouvée pour un échantillon stérile.

Il faut d'ailleurs également remarquer que la teneur en azote non protéique du lait stérile est passée, pendant les 20 jours d'incubation à 30°, de 0,335 mg à 0,390 mg d'azote par gramme de lait.

B) DOSAGE DES COMPOSÉS AZOTÉS DU LAIT CRU ET DU LAIT CHAUFFÉ (tableau VIII)

La fraction des substances azotées précipitables à pH 4,6 passe de 77,0 p. 100 dans le lait cru (caséine) à 83,3 p. 100 de l'azote total dans le lait chauffé à 110°, tandis que la teneur en azote non protéique augmente faiblement ; la teneur en albumine du lactosérum diminue fortement, passant de 10,7 à 4,35 p. 100 de l'azote total ce qui correspond à la dénaturation de 60 p. 100 de la fraction albumine du lait.

Tableau VIII

Dosage des substances azotées du lait
(Essai du 8.9.54)

	Azote pour °/₀₀ de lait						Azote °/₀ de l'azote total				
	Total	Fraction précipitable à pH 4,6	Albumine	Globuline	Protéose-peptone	non protéique	Fraction précipitable à pH 4,6	Albumine	Globuline	Protéose-peptone	non protéique
Lait cru	5,460	4,205	0,590	0,125	0,215	0,330	77,00	10,70	2,35	3,95	6,00
Lait chauffé à 110°	5,430	4,520	0,240	0,135	0,185	0,350	83,30	4,35	2,50	3,35	6,50
Lait chauffé à 120°	5,425	4,510	0,265	0,120	0,180	0,360	83,20	4,55	2,25	3,35	6,65
Lait chauffé à 140°	5,380	4,555	0,150	0,120	0,220	0,335	84,70	2,85	2,20	4,00	6,25

L'effet du chauffage reste sensiblement le même à 120°, mais s'accentue à 140° (l'albumine est dénaturée dans la proportion de 73 p. 100).

La globuline n'est pas précipitée, quelle que soit la température envisagée.

IV. — DISCUSSION

a) Influence de la température de chauffage

Pour les échantillons de même volume, le passage de 110° à 120° fait apparaître une différence significative entre les durées moyennes de conservation tandis que le passage de 120° à 140° fait apparaître pour les échantillons de 125 ml, une différence significative entre les pourcentages d'échantillons stériles (tableau IX). Donc une élévation de la température de chauffage entraîne une augmentation *progressive* de la durée de conservation.

Tableau IX

Comparaison statistique des séries d'échantillons
(Essai du 8.9.54)

		110°			120°	
		125 cc	30 cc froid	30 cc chaud	125 cc	30 cc froid
110°	125 cc (1)					
	30 cc froid (1)	$t = 1{,}74$ T = 2,07				
	30 cc chaud (1)		$t = 1{,}04$ T = 2,10			
120°	125 cc (1)	$t = 7{,}97$ T = 2,05				
	30 cc froid (1)		$t = 9{,}49$ T = 2,12		$t = 1{,}26$ T = 2,09	
	30 cc chaud (1)			$t = 7{,}55$ T = 2,09		$t = 0{,}65$ T = 2,10
140°	125 cc (2)				$d = 0{,}73$ D = 0,35	

(1) Comparaison des durées moyennes de conservation par la méthode de STUDENT

$$t = \frac{m_1 - m_2}{\sum_e \sqrt{\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2}}} \qquad \sum_e = \frac{n_1\sigma_1^2 + n_2\sigma_2^2}{n_1 + n_2 - 2}.$$

Si $t > T$ la différence entre les moyennes est significative.

(2) Comparaison des pourcentages d'échantillons stériles

$$\sigma_e^2 = Q_e(1 - Q_e)\left(\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2}\right) \qquad Q_e = \frac{a_1 + a_2}{n_1 + n_2}$$

$$d = \frac{a_1}{n_1} - \frac{a_2}{n_2} \qquad D = 1{,}96\ \sigma_e.$$

Si $d > D$ la différence entre les pourcentages est significative.

Il est intéressant d'autre part de noter la lenteur du développement microbien dans certains des échantillons chauffés. Ce phénomène a déjà été souvent signalé pour les conserves alimentaires et il est attribué au fait que les spores qui ont subi une action thermique sub-léthale peuvent avoir une germination retardée dans des milieux qui permettent la germination et le développement rapide des spores n'ayant pas subi la même action thermique (FOSTER et WYNNE (9)). D'où l'importance d'une période d'incubation suffisamment prolongée pour donner à ces spores, affaiblies par le chauffage, le maximum de chances de se développer.

L'examen de la nature des germes isolés aux diverses températures (tableau VI) fait apparaître une différence entre 110° et 120° d'une part, — où l'on retrouve uniquement des sporulés — et 140° d'autre part, où

l'on retrouve 3 fois des sporulés mais 6 fois des germes non sporulés (Microcoques). Ces derniers ont été détruits par une pasteurisation au laboratoire et, en raison de ce défaut de thermorésistance, leur présence dans le lait qui a subi le chauffage à 140° est en faveur d'une contamination dans l'appareil de refroidissement ou au niveau du prélèvement. Mais on doit remarquer que la résistance des Microcoques à l'action du chauffage et leur présence dans des conserves alimentaires portées à des températures relativement élevées a déjà été souvent signalée (10, 11, 12).

En ce qui concerne la contamination possible dans l'appareil la comparaison pour une même température de chauffage entre les tubes de 30 ml de lait prélevé chaud et de lait prélevé froid n'apporte aucun argument pour ou contre une contamination par les Microcoques (tableau IX). En effet, à 110° et 120° la différence entre les durées moyennes de conservation des deux séries d'échantillons (lait chaud et lait froid) n'est pas significative et l'examen bactériologique, nous l'avons vu, révèle seulement la présence des sporulés dont le développement a vraisemblablement empêché celui des Microcoques.

A 140° le nombre trop faible d'échantillons renfermant des germes microbiens ne permet pas de faire une comparaison statistique valable entre les deux sortes de lait, chaud et froid.

Il n'est donc pas possible de se prononcer pour ou contre l'hypothèse d'une contamination par les Microcoques dans l'appareil de refroidissement. Mais si la contamination s'est réellement produite, elle n'altère en rien nos conclusions quant à l'effet progressif de la température puisqu'à 110° et 120° la présence de Microcoques n'a pas eu d'influence sur la durée de conservation du lait et qu'il existe d'autre part, entre 140° et 120°, une différence significative quant à la proportion d'échantillons stériles.

b) **Effet du volume des échantillons prélevés à une même température**

Comme il n'y a pas de différence significative, ni à 110° ni à 120°, entre les moyennes de durée de conservation des flacons de 125 ml et des tubes de 30 ml de lait prélevé froid (tableau IX), il paraît possible de multiplier les échantillons en réduisant le volume à 30 ml, volume qui est suffisant pour entreprendre les tests utilisés dans cette étude.

Mais ceci n'est valable que dans le cadre des résultats obtenus, c'est-à-dire dans l'étude de l'allure de la destruction des microbes au moment où l'on approche de la zone de stérilité : pour définir la limite inférieure de la zone de stérilité d'un appareil industriel de stérilisation du lait, il nous paraîtrait nécessaire d'établir des séries d'au moins 30 échantillons d'un litre pour suivre l'évolution du pourcentage d'échantillons stériles en fonction de la température.

c) La vitesse de développement des germes thermo-résistants dans le lait

La comparaison statistique entre les 2 séries d'essais (juillet et septembre) n'est pas permise en raison du trop petit nombre d'échantillons prélevés en juillet. Cependant la différence entre les durées moyennes de conservation des échantillons chauffés à 120° peut être considérée comme très forte : il est permis de l'attribuer soit à un changement (entre juillet et septembre) des propriétés du lait en tant que milieu de culture pour les germes thermo-résistants, soit au nombre différent des germes sporulés initialement présents dans le lait cru, soit enfin au fait que le point d'altération « visible » ne correspond pas, pour chaque série d'échantillons, à la formation dans un volume de lait déterminé d'un même nombre de cellules microbiennes.

d) Les altérations du lait résultant du développement microbien

A 140°, 55 p. 100 des échantillons non stériles possèdent, au point de vue des tests mesurant la stabilité du lait (pH, alcool, ébullition), les mêmes caractéristiques que les échantillons stériles : l'examen bactériologique est donc indispensable pour vérifier la stérilité, et les tests rapides, — s'ils permettent un triage préliminaire dont l'utilité pratique peut être grande — ne sont pas à eux seuls suffisants.

La mesure de la teneur en azote non protéique, par le Kjeldahl ou l'absorption en U. V., porte seulement sur un petit nombre d'échantillons. Néanmoins on a décelé avec cette méthode un début d'altération sur des échantillons reconnus positifs à l'analyse bactériologique, mais pour lesquels aucun des autres tests rapides n'avait donné de réponse.

La mesure en ultra-violet qui se prête bien à l'examen en série pourrait donc rendre de réels services dans la pratique. Il faut noter cependant que l'augmentation de la teneur en azote non protéique au cours de la période d'incubation, même chez les échantillons reconnus stériles, donne à ce test la valeur d'un élément de comparaison. Il paraît plus difficile, sans diminuer la sensibilité de l'épreuve, de déterminer une « valeur seuil » d'azote non protéique au-delà de laquelle on pourrait conclure à la non stérilité de l'échantillon.

e) Action de la température de chauffage sur l'albumine et la globuline

La fraction précipitable à pH 4,6 représente la caséine dans le cas du lait cru. L'augmentation de cette fraction dans le lait à 110° indique une dénaturation partielle de l'albumine qui précipite alors en même temps

que la caséine à pH 4,6. Le passage de 110° à 140° n'augmente que faiblement cette proportion d'albumine précipitée. Ceci, lié au fait que la globuline n'est pratiquement pas atteinte par le chauffage, tend à faire penser que la dénaturation de l'albumine se produit au cours du préchauffage qui porte le lait de la température ambiante à 80° à une allure beaucoup moins rapide que celle qui intéresse la deuxième partie du chauffage (80°-140°).

RÉSUMÉ

L'étude du chauffage du lait à des températures graduellement croissantes — 110°, 120° et 140° pendant une fraction de seconde — a permis de mettre en évidence les faits suivants :

1° L'élévation de la température de chauffage entraîne un allongement progressif de la durée de conservation correspondant à une réduction également progressive du nombre des germes qui survivent au chauffage.

2° L'incubation de volumes de lait assez réduits permet d'étudier l'allure de la destruction des germes au moment où l'on approche de la zone de stérilité à condition de prélever un nombre suffisant d'échantillons.

3° Les tests rapides (pH, coagulation à l'alcool ou à l'ébullition, teneur en azote non protéique) ne peuvent pas remplacer l'examen bactériologique mais ils permettent d'écarter un certain pourcentage d'échantillons non stériles après incubation du lait et de réserver l'examen bactériologique complet aux échantillons pour lesquels les tests rapides se sont révélés négatifs.

4° Avec le type d'appareil utilisé, la proportion d'albumine dénaturée représente 60 p. 100 à 110° et 73 p. 100 à 140° de la fraction albumine du lait. Dans les mêmes conditions, la globuline n'est pratiquement pas atteinte par le chauffage.

(*Reçu pour publication le 4 avril 1955*).

Nous remercions en terminant MM. AUCLAIR, PORTMANN et MOURGUES de l'aide qu'ils nous ont apportée dans une partie de ce travail.

Nos remerciements vont également à M. ETAVE, Directeur de l'École de Laiterie de Surgères et à ses collaborateurs qui ont grandement facilité l'organisation matérielle de nos essais.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

(1) BURTON (H.), AKAM (D. N.), THIEL (C. C.), GRINSTED (E.) et CLEGG (L. F. L.). — Some investigations into the batch process of Milk Sterilization, *J. Soc. Dairy Techn.*, **6**, 98 à 113, 1953.

(2) RIDGWAY (J. D.). — Some recent observations on the Bacteriology of Sterilized Milk, *J. Applied Bact.*, à paraître en 1955.

(3) ROWLAND (S. J.). — The heat denaturation of albumin and globulin in milk, *J. Dairy Res.*, **8**, 1 à 14, 1937.

(4) MOSSEL (D. A. A.) et DRION (E. F.). — Bacteriological requirements for and testing of sterilized milk and sterilized milk products, *Neth. Milk and Dairy J.*, **8**, 106 à 114, 1954.
(5) HIRSCH (A.) et GRINSTED (E.). — Methods for the growth and enumeration of anaerobic spore formers from cheese with observation on the effect of nisin, *J. Dairy Res.*, **21**, 101 à 109, 1954.
(6) MARINO (F.). — Méthode pour isoler les Anaérobies, *Ann. Inst. Past.*, **21**, 1005 à 1008, 1907.
(7) ROWLANDS (A.), BARKWORTH (H.), HOSKING (Z.) et KEMPTHORNE (O.). — Dye tests as measures of the keeping quality of milk, *J. Dairy Res.*, **17**, 160 à 186, 1950.
(8) ROWLAND (S. J.). — The determination of the nitrogen distribution in milk, *J. Dairy Res.*, **9**, 42 à 46, 1938.
(9) WYNNE (E. S.) et FOSTER (J. W.). — Physiological studies on spore germination with special reference to *Clostridium botulinum*, *J. Bact.*,**55**, 61 à 73, 1948.
(10) MURRAY (J. C.). — Ropiness in pasteurized milk due to a heat resistant *Micrococcus*, *Proc, Soc. Applied Bact.*, **2**. 91 à 95, 1946.
(11) SPECK (M. L.). — The résistance of *Micrococcus Freudenreichii* in laboratory high-temperature-short-time pasteurization of milk and ice cream mix, *J. Dairy Sc.*, **30**, 975 à 981, 1947.
(12) SPECKEN (M. L.), — Some observations on the high-temperature-short-time pasteurization of chocolate milk, *J. Dairy Sc.*, **34**, 333, à 341 1951.

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE DES BOISSONS ALCOOLIQUES

II. — ÉTUDE COMPARÉE DE DIFFÉRENTS VINS ET DE DIVERSES TECHNIQUES OENOLOGIQUES

PAR

Michel FLANZY, Jean CAUSERET, Denise HUGOT et Jacqueline GUERILLOT

Laboratoire de Physiologie de la Nutrition, Paris
et Station Centrale de Recherches sur l'Œnologie, la Cidrerie et les Jus de Fruits, Narbonne.

PLAN DU MÉMOIRE

I. — **Introduction.**
II. — **Influence du mode de vinification.**
III. — **Influence de l'origine géographique des cépages.**
IV. — **Influence comparée de vins de Vitis Vinifera et d'un vin deNoah.**
V. — **Influence du sulfitage.**
VI. — **Influence du traitement au ferrocyanure de potassium.**
VII. — **Influence de l'âge des vins.**
VIII. — **Conclusions.**

I. — INTRODUCTION

Dans un mémoire antérieur (6), nous avons attiré l'attention sur la nécessité d'entreprendre une étude systématique des principales boissons alcooliques, en particulier du vin.

Nous précisions, dans une première série de travaux, qu'il s'agissait et qu'il s'agirait avant tout de classer les boissons en fonction de leurs effets physiologiques ; dans une deuxième série serait recherchée la cause profonde des phénomènes physiologiques constatés.

Le présent mémoire s'intègre encore dans la première série des travaux. On peut nous reprocher de ne pas aborder encore la deuxième partie du programme. Il est évident que la logique voudrait que les deux

séries de recherches fussent menées simultanément. Cela suppose des moyens matériels et humains suffisants. Or, en l'état actuel des choses, ces moyens font défaut. Il est évident que si l'ensemble de tous les travaux, en cours ou projetés sur les boissons alcooliques, était vraiment coordonné, ce programme complet pourrait être mis en train.

De toute façon, pour l'instant, il nous faut choisir entre : la sélection physiologique des boissons et l'étude de ces effets. Comme il est essentiel de distinguer le plus tôt possible le bon du mauvais, ou au moins, de l'indifférent, notre choix est aussi naturel que logique. Il a d'ailleurs l'avantage d'apprécier physiologiquement les techniques d'élaboration ou de consommation des produits étudiés, et par conséquent, de donner à la Technologie les assises physiologiques qui lui font trop souvent défaut. Ce résultat justifie à lui seul le déroulement chronologique de nos travaux.

Un premier travail expérimental nous a permis de comparer, dans des conditions rigoureusement identiques, les effets d'un vin rouge naturel et de dilutions au même titre, soit d'eau-de-vie obtenues en distillant ce vin, soit d'alcool pur. En utilisant le rat comme animal-réactif, nous avons ainsi montré qu'aux doses administrées, et même après une longue durée, le vin naturel ne présentait aucune toxicité décelable au moyen des critères employés, tandis que les dilutions d'eau-de-vie, et plus encore la dilution d'alcool, entraînaient des effets physiologiques défavorables : ralentissement de la croissance, développement de lésions anatomiques.

Dans notre conclusion, nous écrivions : « Il apparaît donc qu'au point de vue physiologique et toxicologique, on n'a pas le droit de confondre le vin et une simple dilution alcoolique. *Mais il importe de remarquer que ceci est valable, pour l'instant, pour le vin et les alcools étudiés, car il n'est pas du tout certain que tous les vins se comportent de la même façon* ».

Dans une nouvelle série de travaux, nous avons recherché l'influence des modes de vinification, de la nature du cépage, de certains traitements et de l'âge du vin sur ses qualités physiologiques.

A cet effet, nous avons utilisé les vins suivants, d'origine exactement connue, puisque les vinifications et traitements correspondants ont été effectués par le personnel des Stations, ou de Narbonne, ou d'Angers, sur des lots de raisin bien authentifiés :

— vins rouges de macération (complète ou partielle) et vin rosé élaborés à partir du même lot de raisin du cépage Carignan de *Vitis vinifera* ;

— vin blanc de *Vitis vinifera* (Muscadet) et vin d'hybride (Noah) ;

— vin blanc (Muscadet) et même vin ou sulfité ou traité au ferrocyanure de potassium ;

— vins rouges de même origine de *Vitis vinifera*, mais d'âges différents.

II. — INFLUENCE DU MODE DE VINIFICATION

1° Position du problème

On sait que l'intérêt alimentaire des vins de macération, obtenus à partir de grappes entières (vins de macération complète) ou de raisin éraflé (vins de macération partielle), est supérieur à celui des vins élaborés à partir du seul jus du raisin : en effet, la présence des râfles et des pellicules dans le moût enrichit considérablement ce dernier en tanins et en principes nutritifs tels que le phosphore, le fer (3) et l'acide ascorbique (11, 22).

Puisque l'éraflage et l'enlèvement des pellicules abaissent la valeur alimentaire du vin, il faut évidemment se demander s'ils n'affectent pas aussi son action physiologique dans un sens défavorable. Ce problème ne semble pas avoir retenu jusqu'ici l'attention des expérimentateurs.

2° Recherches personnelles

Nos recherches ont porté comparativement sur trois vins naturels obtenus à partir d'un même lot de raisins de Carignan de Nouvelles-Tuchan (récolte 1951) :

le vin I, dit de macération complète, résultait de la fermentation du raisin entier, soigneusement foulé ;

le vin II, dit de macération partielle, résultait de la fermentation du raisin foulé et aussitôt après éraflé : la macération s'est alors produite avec les pellicules seulement ;

le vin III provenait de la fermentation du seul jus du raisin séparé, avant la fermentation, des râfles et des pellicules correspondantes.

Les résultats de l'analyse sommaire de ces trois vins sont indiqués dans le tableau I.

TABLEAU I

Analyse sommaire des trois vins utilisés dans l'expérience I

	Vin I (1951)	Vin II (1951)	Vin III (1951)
Alcool, p. 100 en volume (degré)	12,30	12,10	13,00
Extrait sec à 100	25,78	27,25	29,30
Sucres, en g p. litre	2,80	3,60	6,16
Acidité totale	5,35	5,90	4,80
Acidité volatile	0,22	0,25	0,30
Acidité fixe	5,13	5,65	4,50

Comme sujets d'expérience, nous avons utilisé 48 rats blancs de sexe mâle, qui pesaient initialement de 60 à 90 g. Ces animaux ont été soumis à un régime alimentaire équilibré de composition suivante : *peptone pancréatique*, 18 ; *huile d'arachide*, 9 (1) ; *amidon*, 40 ; *saccharose*, 22 ; *mélange salin* de HUBBEL et coll., 4 ; *levure sèche*, 5 ; *agar-agar*, 2. En vue d'éviter le gaspillage et de permettre la détermination des quantités de nourriture consommée, ce régime était présenté aux animaux sous forme de bouillie préparée par incorporation de 350 g d'eau à 1 000 g de mélange sec.

Après deux semaines d'observation, les rats, qui pesaient alors de 110 à 140 g, ont été répartis en quatre lots aussi comparables que possible, cette répartition étant basée sur le poids, la vitesse de croissance et la consommation de nourriture.

La période expérimentale proprement dite a duré 15 semaines. Durant cette période, tous les animaux ont continué à recevoir le régime dont la composition a été indiquée plus haut. Mais, à l'exception d'un lot conservé comme témoins, chacun reçut quotidiennement, par intubation gastrique (2), 3 ml pour 100 g de poids corporel, d'une dilution à 10° d'alcool préparée à partir de l'une des boissons à comparer :

Lot I : vin rouge I, de macération complète ;
Lot II : vin rouge II, de macération partielle ;
Lot III : vin rosé III.
Les rats conservés comme témoins formaient le *lot IV*.

Dans aucun des lots, les *signes d'ivresse* n'ont été très marqués. Cependant, nous avons observé assez souvent, surtout chez les sujets du lot III qui recevaient du vin rosé, des signes très nets d'apathie après l'intubation : placés sur une grille inclinée à 45°, les animaux se laissaient glisser ou même rouler, tandis que les témoins s'y agrippaient.

L'étude de l'évolution du poids des animaux et de leurs indices de consommation (*tableau II*) conduit à des conclusions beaucoup plus nettes.

On voit qu'aux doses administrées, les deux vins rouges de macération I et II ont donné des résultats très satisfaisants. Le développement pondéral des sujets des lots I et II est rigoureusement identique à celui des témoins du lot IV, tandis que leur indice de consommation est abaissé de 11 p. 100. Cette amélioration apparente du « rendement de croissance » de la nourriture chez les animaux des lots I et II semble s'expliquer par l'apport d'énergie dû aux vins administrés : en effet, le pouvoir énergétique de l'alcool étant de 7 calories par gramme, on peut calculer que l'apport moyen correspondant est égal, pour les lots I

(1) Additionnée de 1 p. 100 d'huile de foie de morue titrant 2 000 U.I de vitamine A et 500 U.I. de vitamine D par ml.
(2) La technique d'intubation a été décrite dans une publication antérieure (6).

TABLEAU III

Gains de poids et indices de consommation

(Expérience I)

Lots	Gains de poids		Indice de consommation	
	absolus	relatifs (1)	absolus	relatifs (1)
	g p. jour	p. 100	g p. jour	p. 100
Lot I (vin rouge I, de macération totale)	1,46 ± 0,04	100	7,5	89
Lot II (vin rouge II, de macération partielle)	1,45 ± 0,02	99	7,5	89
Lot III (vin rosé III)	1,23 ± 0,05	84	8,6	102
Lot IV (témoins)	1,46 ± 0,03	100	8,4	100

(1) En posant égaux à 100 le gain de poids et l'indice de consommation du lot IV.

et II, à 10-12 p. 100 de celui qu'assure le régime. On peut donc penser que les rats des lots I et II, qui recevaient du vin, ont réduit spontanément leur consommation de nourriture, l'apport total d'énergie demeurant inchangé.

Avec le vin rosé III, les résultats sont nettements moins bons. Le gain de poids moyen est inférieur de 16 p. 100 à celui des témoins, la différence étant significative. Mais la consommation de nourriture est réduite dans une proportion sensiblement égale, de sorte que l'indice de consommation est le même que pour les témoins. De ce point de vue, l'action du vin rosé sur l'organisme a donc été moins favorable que celle des vins de macération élaborés à partir du même lot de raisin.

Les nécropsies des sujets en expérience n'ont pas apporté de précisions nouvelles : aucun de ces sujets ne présentait de particularités anatomo-pathologiques particulières et le poids moyen des organes (foie, reins, cœur, rate, surrénales, organes génitaux) était le même pour tous les lots.

Ces résultats n'autorisent évidemment pas de conclusions générales. Cependant, ils conduisent à se demander s'il n'existerait pas, dans les pellicules et peut-être dans les râfles du raisin, des substances qui modifieraient dans un sens favorable l'action physiologique du vin.

III. — INFLUENCE DE L'ORIGINE GÉOGRAPHIQUE ET DU CÉPAGE

1° Position du problème

Dans une publication antérieure (6), nous avons attiré l'attention sur le fait que, même à l'état naturel, tous les vins n'exercent pas

nécessairement la même action sur l'organisme : d'où la nécessité de multiplier les comparaisons entre vins élaborés dans des conditions comparables, mais d'origine géographique ou de cépage différents, avant d'envisager une généralisation des résultats expérimentaux obtenus avec l'un d'entre eux.

Il nous a donc paru intéressant d'étudier comparativement deux vins répondant à ces conditions.

2° Recherches personnelles

a) **Influence comparée de deux vins de même cépage (Carignan) mais d'origine géographique différente.**

Les deux vins comparés étaient :

— le vin rouge de Nouvelles-Tuchan (récolte 1951), de macération complète, désigné dans l'expérience précédente sous le nom de *vin I* ;

— un vin rouge (récolte 1951), vinifié à Treilles (Aude), également issu du cépage Carignan et de macération complète. Ces vins ont la même appellation contrôlée « Fitou ». Les vignobles correspondants sont situés environ à 20 km de distance et sur des terrains identiques échelonnés du dévonien au jurassique.

La composition de ces deux vins est indiquée dans le *tableau III*.

Tableau III

Analyse sommaire des deux vins utilisés dans l'expérience IIa

	Vin de Nouvelles-Tuchan (1951)	Vin de Treilles (1951)
Alcool, p. 100 en volume (degré)	12,30	10,50
Extrait sec à 100	25,78	20,01
Sucres, en g p. litre	2,80	—
Acidité totale	5,35	4,20
Acidité volatile	0,22	0,35
Acidité fixe	5,13	3,85

Ces vins se distinguent par une différence sensible de degré alcoolique et d'extrait.

L'étude expérimentale a été conduite en même temps que l'expérience I, donc dans les mêmes conditions, les deux vins étant ramenés au même degré d'alcool (10°), puis administrés quotidiennement à la dose de 3 ml pour 100 g de poids corporel.

Bien que leur composition soit assez différente, il n'a été possible de mettre en évidence aucune différence significative entre les effets physiologiques des deux vins. Voici, par exemple, la valeur des gains de poids et des indices de consommation en fin d'expérience (*tableau IV*).

TABLEAU IV

Gains de poids et indices de consommation
(Expérience II*a*)

	Gains de poids		Indices de consommation	
	absolus	relatifs (1)	absolus	relatifs (1)
		p. 100	g p. jour	p. 100
Lot I (vin de Tuchan)	1,46 ± 0,04	100	7,5	89
Lot II (vin du cépage de Carignan)	1,48 ± 0,04	101	7,5	89
Lot III (témoins)	1,46 ± 0,03	100	8,4	100

(1) En posant égaux à 100 le gain de poids et l'indice de consommation du lot III.

b) **Influence comparée de deux types de vin de Vitis Vinifera (vin rouge et vin blanc).**

Ces deux vins de cépages différents de *Vitis Vinifera* étaient :

— un vin rouge de Nouvelles-Tuchan (récolte 1952), de macération complète ;

— un vin blanc de Muscadet (récolte 1952).

Les résultats de l'analyse de ces vins sont indiqués dans le *tableau V*.

TABLEAU V

Analyse sommaire des vins utilisés dans l'expérience IIb

	Vin rouge de Carignan (1952)	Vin blanc de Muscadet (1952)
Alcool p. 100 en volume (degré)	13,35	11,20
En g par litre :		
Extrait sec à 100°	23,20	17,65
Sucres	1,80	1,50
En g d'acidité sulfurique par litre		
Acidité totale	4,20	5,10
Acidité volatile	0,60	0,46
Acidité fixe	3,60	4,64

Le protocole expérimental, d'abord identique à celui des deux expériences précédentes, a été par la suite modifié. Durant une première période de 16 semaines, les animaux ont tous reçu (à l'exception des témoins), une dose quotidienne de 3 ml pour 100 g de poids corporel, d'une dilution à 10° préparée à partir de l'un des deux vins à comparer.

Après cette première période de 16 semaines, il n'y avait apparemment aucune différence entre les divers lots, et par ailleurs les calculs de consommation n'étaient pas terminés. On verra plus loin la confirmation de l'excellent comportement des vins.

Nous avions donc la ressource, soit de subdiviser chaque lot en deux

moitiés, en sacrifier une et continuer les essais sur l'autre — mais c'était réduire chaque lot à un nombre trop faible d'animaux — soit encore de poursuivre les essais jusqu'à apparition éventuelle de différences notables, mais en augmentant les doses de boissons. Cette dernière solution avait l'avantage de conserver par lots un nombre suffisant d'animaux, et de montrer les effets d'une consommation élevée.

Les doses administrées ont alors été doublées pendant deux semaines (2 intubations par jour, soit 6 ml pour 100 g de poids), puis triplées pendant 6 semaines (3 intubations par jour, soit 9 ml pour 100 g de poids).

La recherche systématique des signes d'ivresse n'a permis de mettre en évidence aucune différence constante dans le comportement des animaux des divers lots. Pendant la première période de 16 semaines, tous les sujets ont parfaitement supporté la dose quotidienne unique de vin. Par contre, au cours des 2 semaines suivantes, la seconde intubation, pratiquée plusieurs heures après la première, a tout d'abord entraîné de l'apathie et une disparition momentanée des réflexes : il a suffi cependant de quelques jours pour que les animaux s'adaptent aux nouvelles conditions d'expérience. Enfin, pendant la troisième période, les 2e et 3e intubations ont provoqué régulièrement une prostration complète : plusieurs heures chaque jour, la plupart des sujets étaient ivres-morts. Cependant, certains jours, les animaux qui avaient reçu le vin de Muscadet manifestèrent, après les intubations, une agitation particulière.

TABLEAU VI

Gains de poids et indices de consommation

(Expérience II*b*)

	Gains de poids		Indices de consommation	
	absolus	relatifs (1)	absolus	relatifs (1)
	g p. jour	p. 100	g p. jour	p. 100
Après 16 semaines				
Lot I (Tuchan)	1,49 ± 0,04	102	7,3	91
Lot II (Muscadet)	1,51 ± 0,05	103	7,3	91
Lot III (Témoins)	1,46 ± 0,03	100	8,0	100
Après 24 semaines				
Lot I (Tuchan)	0,96 ± 0,04	86	11,0	102
Lot II (Muscadet)	0,96 ± 0,04	86	11,0	102
Lot III (Témoins)	1,11 ± 0,03	100	10,8	100

(1) En posant égaux à 100 le gain de poids et l'indice de consommation du lot III.

En ce qui concerne le développement pondéral, les deux lots d'animaux qui recevaient du vin se sont comportés de la même manière pendant toute la durée de l'expérience (*tableau VI*) : leur gain de poids,

au cours de la première période de 16 semaines est égal à celui des témoins ; par contre, sur toute la durée de l'expérience (24 semaines), il apparaît plus faible.

A l'autopsie, on observe assez fréquemment, chez les animaux des lots I et II un léger état congestif des vaisseaux du mésentère et la présence d'une abondante quantité de gaz dans l'estomac, le duodenum, le jejunum et le cœcum. De plus, le poids du foie des animaux des deux mêmes lots (par rapport au poids de leur corps) est supérieur d'environ 20 p. 100 à celui des témoins.

	$\frac{\text{Poids du foie}}{\text{Poids corporel}} \times 100$
Lot I (Tuchan)	4,58 ± 0,23
Lot II (Muscadet)	4,65 ± 0,22
Lot III (Témoins)	3,85 ± 0,12

Ce résultat n'est pas en contradiction avec les constatations précédentes faites chez les animaux qui recevaient du vin rouge de Tuchan (expérience I). Il est à remarquer, en effet, que dans le cas présent, l'examen anatomique a été fait sur des animaux ayant tous reçu des doses excessives de vin (6 et même 9 ml par jour p. 100 g de poids) pour les raisons indiquées plus haut. Il démontre simplement les mauvais effets de telles doses de boisson alcoolique.

De nouveaux essais sont nécessaires pour déterminer l'état anatomique d'animaux ayant reçu du vin de Muscadet à la dose de 3 ml par jour pour 100 g de poids pendant une durée de 15 à 20 semaines.

Avec les critères utilisés on ne peut donc établir aucune différence entre les effets généraux des deux vins étudiés sur l'organisme.

Ces résultats sont assez surprenants si on les rapproche des résultats obtenus au cours de la comparaison entre vins rouges et vin rosé (expérience I) car ce dernier, au point de vue technique de vinification, est assimilable au vin blanc.

On pourrait alors faire l'hypothèse que la pulpe du Muscadet est plus riche en composés favorables que la pulpe du Carignan. Dans le cas de ce dernier, c'est la pellicule qui renfermerait ces substances.

Ces résultats démontrent de toute façon la nécessité de poursuivre une expérimentation comparée et complète entre cépages rouges et cépages blancs.

IV. — INFLUENCE COMPARÉE DE VINS DE VITIS VINIFERA ET DE VINS D'HYBRIDES

1° Position du problème

Les vins de Noah présentent une singularité analytique : avec les vins Othello, ce sont parmi tous les vins analysés jusqu'à présent, ceux

qui ont en général la plus grande richesse en alcool méthylique ; les vins de *Vitis vinifera* contenant en moyenne de 50 à 100 mg de méthanol par litre, ces vins hybrides en possèdent une dose supérieure à 100 mg, quelquefois égale ou supérieure à 200 mg.

Le Dr de Leobardy (14) a constaté, chez l'Homme, une intolérance nette au vin de Noah, à des doses beaucoup moins élevées qu'avec les vins de *Vitis vinifera*. Nous avons donc comparé les effets physiologiques de vins de Noah et de vins de *Vitis vinifera*.

2° Recherches personnelles

Cette comparaison a été effectuée à deux reprises, en même temps que celles dont les résultats ont été rapportés précédemment (expériences I et II *b*).

Nous avions émis quelque doute sur l'authenticité du vin de Noah. C'est pourquoi, avant toute publication, nous avons repris l'expérimentation l'année suivante avec du vin de Noah vinifié à la Station d'Angers avec des raisins bien authentifiés.

Voici l'analyse sommaire de ce vin de Noah.

Tableau VII

Analyse sommaire d'un vin de Noah

	Vin de Noah (1952)
Alcool p. 100 en volume (degré)	10°40
Extrait sec à 100°	16,65
Sucres en g p. litre	1,60
Acidité totale en g p. litre	5,40
» volatile en g p. litre	0,60
» fixe en g. p. litre	4,80
Alcool méthylique en mg p. litre	120,00
Manganèse en mg p. litre	3,90

Nous ne reviendrons pas sur les techniques utilisées : elles étaient en tous points semblables à celles qui ont été décrites plus haut pour les expériences I et II *b*.

L'administration de vins de Noah n'a pas entraîné de signes d'ivresse plus manifestes que celle des vins de *Vitis vinifera*. En ce qui concerne leur effet sur le développement pondéral, les résultats obtenus sont les suivants (*tableau VIII*) si l'on prend comme boissons de comparaison, dans la première série d'essais, les vins rouges de Tuchan de macération totale et de l'année ; et dans la deuxième série d'essais, le vin rouge de Tuchan de macération de 1952 et le vin de Muscadet (vin blanc) de 1952.

On voit que, dans les deux cas, les vins de Noah ont donné des résultats moins satisfaisants que les vins de *Vitis vinifera* ; l'augmentation des indices de consommation indique bien qu'il s'agit là d'un effet

TABLEAU VIII

Gains de poids et indices de consommation

(Expérience III)

Lots	Gains de poids		Indices de consommation	
	absolus	relatifs (1)	absolus	relatifs (1)
	g p. jour	p. 100	g p. jour	p. 100
1ere série de comparaisons				
Après 15 semaines				
Lot I (Truchan 1951)	1,46 ± 0,04	100	7,5	89
Lot III (Noah 1951)	1,27 ± 0,02	87	9,1	108
Lot IV (Témoins)	1,46 ± 0,03	100	8,4	100
2eme série de comparaisons				
Après 16 semaines				
Lot I (Tuchan 1952)	1,49 ± 0,04	102	7,3	91
Lot II (Noah)	1,38 ± 0,03	94	8,3	104
Lot III (Témoins)	1,46 ± 0,04	100	8,0	100
Lot IV (Muscadet 1952)	1,51 ± 0,05	102	7,3	91
Après 24 semaines				
Lot I (Tuchan 1952)	0,96 ± 0,04	86	11,0	102
Lot II (Noah 1952)	0,88 ± 0,03	79	12,4	115
Lot III (Témoins)	1,11 ± 0,03	100	10,8	100
Lot IV Muscadet 1952)	0,96 ± 0,03	86	11,0	102

(1) En posant égaux à 100 le gain de poids et l'indice de consommation du lot III,

direct des vins de Noah, indépendant de la quantité de nourriture ingérée.

Quant à l'étude macroscopique des organes, elle n'a permis de mettre en évidence aucune différence notable entre les animaux qui recevaient du vin de Tuchan ou de Muscadet et ceux qui recevaient du vin de Noah Les anomalies anatomiques observées étaient les mêmes dans les deux cas (état congestif des vaisseaux du mésentère, présence de gaz dans le tube digestif, hypertrophie du foie) : comme nous l'avons souligné à propos d'une autre expérience, ces anomalies peuvent s'expliquer par l'administration de fortes doses de vin au cours des dernières semaines.

V.— INFLUENCE DU SULFITAGE

1° Position du problème

L'anhydride sulfureux est couramment employé en œnologie dans des conditions bien définies, soit pour ses effets sélectifs sur la flore microbienne, soit pour ses propriétés réductrices.

Lorsqu'il est conduit sans précautions, le sulfitage peut entraîner une certaine diminution de la valeur vitaminique du vin. Si la riboflavine (vitamine B_2), la pyridoxine (vitamine B_6) et l'acide pantothénique paraissent se maintenir dans les vins blancs sulfités, il n'en serait pas de même de la thiamine (vitamine B_1) qui disparaîtrait dans une proportion importante sous l'effet de SO_2 libre (18, 20). Toutefois, il est juste de souligner que, même s'il n'est pas sulfité, le vin ne peut constituer qu'une source très secondaire de thiamine.

Beaucoup plus importants apparaissent les problèmes relatifs à l'effet direct sur l'organisme du consommateur, de l'anhydride sulfureux libre et combiné présent dans les vins sulfités.

Cet effet a été étudié anciennement par LEUCH (15) qui administra, à une trentaine de personnes, diverses doses de SO_2 dans une petite quantité de vin (30 à 50 ml). Il n'observa d'accidents — irritation de la gorge, brûlures d'estomac, migraines — que pour des doses de SO_2 libre égales ou supérieures à 45 mg. Un peu plus tard, WILEY (23) parvint, chez l'Homme, à des conclusions plus défavorables : chez 12 sujets qui avaient reçu pendant 20 jours des doses croissantes de SO_2 en solution aqueuse (80 à 100 mg) ou sous forme de sulfite de soude en capsules (115 à 760 mg), il signala, — outre des symptômes subjectifs tels que maux de tête, étourdissements, faiblesse, — des troubles rénaux et une diminution de la teneur du sang en hématies et en hémoglobine. Il en conclut à la nécessité de proscrire SO_2, sous toutes ses formes, de toutes les denrées alimentaires.

Ces conclusions, acquises dans des conditions expérimentales très particulières, ayant ému les viticulteurs, une Commission Scientifique fut constituée en 1910, pour reprendre l'étude du problème sous son aspect œnologique. Sous l'impulsion de cette Commission (9), une première série de recherches fut effectuée sur des chiens qui reçurent quotidiennement, durant un mois, 10 ml par kg de poids, d'un vin contenant 100 mg de SO_2 libre ou 400 mg de SO_2 total (dont 300 mg à l'état combiné) par litre. En aucun cas, on n'observa de troubles gastriques, rénaux ou sanguins ; à l'autopsie, tous les organes étaient normaux.

Une seconde série d'expériences fut tentée sur 6 hommes qui, pendant plusieurs semaines, ingérèrent chaque jour 15 à 20 ml par kg de poids, d'un vin renfermant 400 mg de SO_2 total (dont 300 mg à l'état combiné) ; aucun sujet ne fut atteint de troubles rénaux ou sanguins.

Cependant, la durée de ces expériences apparaît bien courte pour qu'on puisse les considérer comme vraiment probantes. Il nous a donc semblé utile de reprendre l'étude du problème en suivant de manière prolongée des animaux recevant des doses élevées de vin sulfité.

2° Recherches personnelles

Nos recherches ont porté sur le vin de Muscadet déjà utilisé dans l'expérience II*b*. Ce vin, préalablement ramené à 10° par addition d'eau distillée, a été administré sous trois formes différentes, à 3 lots de 12 rats chacun :

— lot I : vin naturel ;

— lot II : même vin sulfité à l'avance (une semaine avant le début de l'expérience), par addition de 400 mg de métabisulfite de potassium par litre, soit 200 mg de SO_2 total puis conservé en bouteilles bouchées hermétiquement jusqu'au moment de l'utilisation ;

— lot III : même vin sulfité quotidiennement à la même dose, et administré aux animaux dans un délai compris entre 10 minutes et 1 heure après le sulfitage ;

— un dernier lot (*lot IV*) était formé de témoins.

Pour bien connaître les quantités respectives de SO_2 libre et combiné dans le vin ingéré, voici le tableau de leur variation pendant une période de 10 jours.

TABLEAU IX

Variation des formes de SO_2 en fonction du temps (vin blanc Muscadet)

(Avant sulfitation : SO_2 total = 2 mg/l et SO_2 libre = 0)

Temps	SO^2 en mg/litre		
	Libre	Combiné	Total
15 minutes	192	16	208
30 minutes	190	18	208
45 minutes	190	18	208
60 minutes	185	23	208
2 heures	180	28	208
4 jours	153	47	200
7 jours	140	60	200
10 jours	142	54	196

De ces résultats, on déduit que dans le lot III, le SO_2 libre atteignait 190 mg/l, alors qu'il était de 140 mg/l dans le lot II. Une différence plus grande entre les deux vins aurait peut-être été plus significative. Il est à remarquer que la combinaison n'est pas totale après 4 jours — délai fixé par les travaux de MOREAU et VINET.

Durant 16 semaines, les animaux ont reçu quotidiennement 3 ml de vin pour 100 g de poids corporel. Ensuite, la dose administrée a été doublée pendant 2 semaines, puis triplée pendant 6 semaines.

Comme dans l'expérience II *b*, tous les sujets ont fort bien supporté la dose la plus faible, mais la plupart ont manifesté des signes d'ivresse

très accusés lorsque cette dose a été doublée, et surtout lorsqu'elle a été triplée.

L'évolution pondérale des divers lots est indiquée dans le *tableau X*. Il en ressort que la croissance du lot II, et plus encore celle du lot III, est ralentie de manière significative, l'indice de consommation augmentant simultanément dans une proportion sensiblement identique. Les déficits de croissance observés résultent donc bien d'une action directe des vins sulfités sur l'organisme. Ainsi, même une légère différence dans la dose de SO_2 libre produit physiologiquement des différences déjà sensibles.

TABLEAU X

Gains de poids et indices de consommation

(Expérience IV)

Lots	Gains de poids		Indices de consommation	
	absolus	relatifs (1)	absolus	relatifs (1)
	g p. jour	p. 100	g p. jour	p. 100
Après 16 semaines				
Lot I (vin naturel)	1,51 ± 0,05	100	7,3	100
Lot II (vin sulfité à l'avance)	1,31 ± 0,04	87	8,3	114
Lot III (vin sulfité quotidiennement)	1,22 ± 0,03	81	9,0	123
Lot IV (Témoins)	1,46 ± 0,03	97	8,0	110
Après 24 semaines				
Lot I (vin naturel)	0,96 ± 0,04	100	11,0	100
Lot II (vin sulfité à l'avance)	0,86 ± 0,04	90	12,5	114
Lot III (vin sulfité quotidiennement)	0,78 ± 0,04	81	13,7	123
Lot IV (Témoins)	1,11 ± 0,03	116	10,8	98

(1) En posant égaux à 100 le gain de poids et l'indice de consommation du lot I.

D'autre part, l'autopsie des sujets en expérience a permis de constater, en dehors des faits banaux qui ont déjà été signalés (voir expérience II *b*), l'existence d'une hypertrophie du foie beaucoup plus nette chez les animaux du lot III que chez ceux des lots I et II :

	$\frac{\text{Poids du foie}}{\text{Poids corporel}} \times 100$
Lot I (Muscadet naturel)	4,65 ± 0,22
Lot II (Muscadet sulfité à l'avance)	4,39 ± 0,13
Lot III (Muscadet sulfité quotidiennement)	5,30 ± 0,25
Lot IV (témoins)	3,85 ± 0,12

Dans le cas présent, la sulfitation du vin a donc exercé une influence nettement défavorable sur ses effets physiologiques et paraît bien être en relation avec la dose de SO_2 libre.

VI. — INFLUENCE DU TRAITEMENT AU FERROCYANURE DE POTASSIUM

1° Position du problème

La technique de prévention de la casse ferrique, connue sous le nom de « collage bleu », est appliquée légalement dans certains pays, mais est interdite dans d'autres.

Elle a suscité et elle suscite de plus en plus de nombreuses réserves de la part d'un nombre croissant d'œnologues et d'hygiénistes.

Au pH du vin, la décomposition lente du ferrocyanure peut entraîner la formation de cyanures toxiques (21, 19). Bien que les doses de cyanures qui risquent ainsi d'être absorbées par le consommateur soient faibles, la grande majorité des œnologues et des hygiénistes s'est nettement prononcée contre l'emploi du ferrocyanure : outre ses inconvénients psychologiques, il ne leur apparaît pas certain qu'à la longue, l'ingestion répétée de petites quantités d'acide cyanhydrique ne puisse présenter des inconvénients physiologiques.

Cependant, certains techniciens ont pris la défense du collage bleu en faisant remarquer que, lorsqu'il est bien appliqué, ce traitement est d'une parfaite inocuité. Il est permis d'en douter lorsqu'on se reporte, par exemple, aux travaux de CHELLE, DUBAQUIÉ et TURBET (2), qui ont rapporté en particulier les résultats d'un essai mené comparativement sur deux vins blancs partagés chacun en deux parties, dont l'une était acidifiée par l'acide tartrique, l'autre servant de témoin. Ces vins ont été additionnés de ferrocyanure à dose convenable, puis laissés en contact avec le dépôt pendant quelques jours. Pour un vin, c'est la partie témoin qui réagit positivement à la réaction de l'acide cyanhydrique, la partie acidifiée réagissant négativement ; pour l'autre vin, les résultats furent inversés. Des contradictions de ce genre démontrent que le traitement au ferrocyanure est d'une extrême délicatesse et qu'il est impossible de prévoir dans tous les cas l'évolution exacte de tout le ferrocyanure employé. Comme le soulignait récemment l'un d'entre nous (5), « chaque vin semble poser un cas d'espèce dont la solution ne donnera jamais la certitude d'une sécurité suffisante ». En conséquence, il paraît sage, ainsi que le demande CASALE (1), d'accorder plus de poids aux cas où la formation d'acide cyanhydrique a été démontrée qu'à ceux où il est certain qu'elle ne s'est pas produite, même si les premiers sont les moins nombreux.

A côté des recherches analytiques, quelques expériences biologiques ont été consacrées au même problème. Ainsi, FAGOUET (4) dit n'avoir

observé aucun accident chez deux hommes qui, durant trois semaines, avaient ingéré à doses importantes un vin traité au ferrocyanure ou un vin non traité : il en conclut à l'inocuité du procédé. Cette expérience est trop brève pour autoriser une telle conclusion.

2° Recherches personnelles

Dans le cadre de nos recherches sur l'effet physiologique des techniques œnologiques, nous avons comparé les effets du vin de Muscadet naturel utilisé dans l'expérience précédente et du même vin, collé convenablement à la dose de 8 g de ferrocyanure de potassium par hectolitre puis tamisé, collé et filtré. Ces deux vins ont été administrés dans les conditions déjà indiquées : 1 intubation de 3 ml par jour pendant 16 semaines, puis 2 intubations de 3 ml pendant 2 semaines, enfin 3 intubations de 3 ml pendant 6 semaines.

Le traitement du vin au ferrocyanure n'a pas modifié ses effets immédiats : les signes d'ivresse ont été les mêmes qu'avec le vin naturel. Par contre, le développement pondéral des animaux a été affecté assez fortement (*tableau XI*).

Tableau XI

Gains de poids et indices de consommation

(Expérience V)

Lots	Gains de poids		Indices de consommation	
	absolus	relatifs (1)	absolus	relatifs (1)
	g p. jour	p. 100	g p. jour	p. 100
Après 16 semaines				
Lot I (vin naturel)	1,51 ± 0,05	100	7,3	100
Lot II (vin traité au ferrocyanure)	1,24 ± 0,04	82	9,0	123
Lot III (Témoins)	1,46 ± 0,03	97	8,0	110
Après 24 semaines				
Lot I (vin naturel)	0,96 ± 0,04	100	11,0	100
Lot II (vin traité au ferrocyanure)	0,82 ± 0,04	85	13,2	120
Lot III (Témoins)	1,11 ± 0,03	116	10,8	98

(1) En posant égaux à 100 le gain de poids et l'indice de consommation du lot I.

Par ailleurs, l'autopsie des animaux a permis de constater, chez les sujets qui recevaient du vin traité au ferrocyanure :

— une hypertrophie du foie plus marquée que chez les sujets qui recevaient le vin naturel ou les vins sulfités ;

— une hypertrophie des glandes surrénales (environ 30 p. 100) que nous n'avons jamais rencontrée avec d'autres vins.

	$\frac{\text{Poids du foie}}{\text{Poids corporel}} \times 100$	$\frac{\text{Poids des surrénales}}{\text{Poids corporel}} \times 100$
Lot I (Muscadet naturel)	4,65 ± 0,22	0,0155 ± 0,0010
Lot II (Muscadet traité au ferrocyanure)	5,11 ± 0,25	0,0192 ± 0,0009
Lot III (témoins)	3,85 ± 0,12	0,0148 ± 0,0012

Le traitement au ferrocyanure a donc exercé une influence nettement défavorable sur les effets physiologiques du vin de Muscadet utilisé.

VII. — INFLUENCE DE L'AGE DES VINS

1° Position du problème

La comparaison des effets physiologiques de vins élaborés à partir de lots de raisin de même origine, mais de récoltes différentes, pose deux problèmes particuliers :

— d'une année à l'autre, les propriétés biologiques différentes de deux récoltes successives peuvent-elles exercer une influence notable sur celles des vins correspondants ?

— les propriétés biologiques d'un vin déterminé évoluent-elles au cours du temps ?

A notre connaissance, le second problème est seul, jusqu'ici, à avoir suscité quelques recherches. Celles-ci ont porté uniquement sur l'évolution de la valeur alimentaire du vin sous l'influence du vieillissement

Ainsi, pour VENEZIA (22) et pour MERJANIAN (17), l'acide ascorbique (vitamine C) présent en petite quantité dans les vins nouveaux, disparaît en quelques mois. De même, KRAMER et SATTERFIELD (13) n'en ont pas trouvé dans des vins rouges et blancs de 1 an. Ils écrivent à ce propos :

« Ce fait n'a rien pour surprendre, si l'on pense que la vitamine C est facilement oxydable, que les processus de fermentation sont éminemment favorables à la destruction de la vitamine, et que les vins analysés avaient un an ou presque ».

Cependant, d'autres auteurs ne sont pas aussi catégoriques. C'est le cas notamment de GENEVOIS et RIBEREAU-GAYON (10) qui, se basant sur leurs propres analyses, affirment que le vin contient toujours une appréciable quantité de vitamine C, de l'ordre de quelques milligrammes par litre, et que cette quantité peut même s'élever jusqu'à 10 ou 15 mg ; la vitamine y serait protégée contre l'oxydation par l'acide dioxymaléique.

La même incertitude existe en ce qui concerne les facteurs vitami-

niques du groupe B. MORGAN et collab. (18), n'ont observé aucune modification de la teneur en thiamine et en riboflavine dans certains vins californiens après plusieurs mois. Au contraire, JUGENDFEIN (12) note que les vitamines B du vin disparaissent peu à peu au cours du temps.

D'après FLAVIER (8), c'est surtout le taux de riboflavine qui tend à s'abaisser, peut-être en raison de la sensibilité de cette vitamine à l'action de la lumière. Cette hypothèse a été confirmée indirectement par PERLMAN et MORGAN (20), qui ont montré que la riboflavine de vins vitaminisés artificiellement disparaît rapidement lorsque ces vins sont conservés dans des bouteilles de verre blanc, mais qu'elle se maintient de manière satisfaisante lorsqu'on utilise des bouteilles de verre brun. Si le vin est conservé à l'obscurité, comme il est de règle, le problème est pratiquement résolu.

2° Recherches personnelles

Nous avons nous-mêmes entrepris quelques recherches d'ordre physiologique relatives aux deux problèmes soulevés ci-dessus.

A deux reprises, nous avons comparé les effets physiologiques de vins de macération complète élaborés à partir de lots de raisin de récoltes différentes provenant d'un même vignoble :

— en 1951 : comparaison de deux vins du cépage de Carignan, récoltés et vinifiés dans le même lieu, à Treilles (Aude), l'un en 1950, l'autre en 1951 : le premier avait 1 an 1/2 au début de l'expérience, le second 6 mois ;

— en 1952 : comparaison de deux vins de Nouvelles-Tuchan récoltés et vinifiés dans le même lieu, l'un en 1951, l'autre en 1952 : comme dans le cas précédent, le premier avait 1 an 1/2 au début de l'expérience, le second 6 mois.

Tous ces vins sont des vins d'appellation « Corbières ».

La première comparaison, d'une durée de 15 semaines, a porté sur des animaux qui, dans les conditions habituelles, recevaient 3 ml de vin de 10° par jour. La seconde comparaison, d'une durée totale de 24 semaines, a porté sur des animaux qui, dans les mêmes conditions d'expérience, ont reçu quotidiennement 3 ml de vin de 10° pendant 16 semaines, puis 6 ml (en 2 fois) pendant 2 semaines, enfin 9 ml (en 3 fois) pendant les 6 dernières semaines.

Dans chaque série d'expériences, les deux vins ont eu la même influence sur le comportement des animaux à la suite des intubations. Par contre, leurs effets respectifs sur le développement pondéral ont été très différents (*tableau XII*).

Dans les deux séries expérimentales, les résultats concordent : c'est le vin de la récolte récente qui donne les résultats les meilleurs.

Avec celui de la récolte antérieure, — âgé de un an et demi au début des expériences —, la croissance est plus lente surtout si la comparaison est prolongée pendant plusieurs mois avec de fortes doses de vin (2e série expérimentale) : de plus, l'indice de consommation, nettement plus élevé qu'avec le vin de la récolte récente, traduit un effet défavorable du vin le plus ancien sur l'organisme. Dans la seconde série expérimentale, on remarquera en particulier, la forte différence entre les indices de consommation des lots soumis aux vins de Nouvelles-Tuchan 1951 et 1952.

TABLEAU XII

Gains de poids et indices de consommation

(Expérience VI)

	Gains de poids		Indices de consommation	
	absolus	relatifs (1)	absolus	relatifs (1)
	g p. jour	p. 100	g p. jour	p. 100
1ere série d'expériences (1951)				
Après 15 semaines				
Lot I (Carignan 1950).....	1,35 ± 0,04	92	8,3	98
Lot II (Carignan 1951).....	1,48 ± 0,04	101	7,5	88
Lot III (Témoins)	1,46 ± 0,03	100	8,4	100
2eme série d'expériences (1952)				
Après 16 semaines				
Lot I (Tuchan, 1951).....	1,33 ± 0,04	91	8,1	101
Lot II (Tuchan, 1952).....	1,49 ± 0,04	102	7,3	91
Lot III (Témoins)	1,46 ± 0,03	100	8,0	100
Après 24 semaines				
Lot I (Tuchan, 1951).....	0,80 ± 0,03	72	13,0	120
Lot II (Tuchan 1952)	0,96 ± 0,04	86	11,0	102
Lot III (Témoins)	1,11 ± 0,03	100	10,8	100

(1) En posant égaux à 100 le gain de poids et l'indice de consommation du lot III dans chaque expérience.

Malheureusement, il est actuellement fort difficile d'interpréter ces résultats. Sans doute peuvent-ils s'expliquer par un effet défavorable du vieillissement, ce qui apparaît vraisemblable, au moins pour le vin de Tuchan, puisque le vin de la récolte 1951, qui a entraîné en 1952 un ralentissement de la croissance, n'avait pas provoqué d'effet défavorable un an auparavant, aussitôt après son élaboration (voir *expérience I*). Mais ces résultats pourraient peut-être provenir aussi de différences dans les propriétés biologiques des deux récoltes comparées, ce qui n'apparaît pas certain. Il est prudent de poursuivre ces recherches pour être en mesure de retenir l'une de ces deux hypothèses.

VIII. — CONCLUSIONS

Les principales conclusions qui ressortent de nos études expérimentales sont les suivantes :

1° Aux doses administrées (3 ml de vin de 10° pour 100 g de poids corporel pendant 15 semaines), deux vins rouges de macération (complète ou partielle) élaborés à partir d'un même lot de raisin de Carignan des Corbières (Nouvelles-Tuchan), n'ont exercé apparemment aucune action défavorable sur l'organisme de jeunes rats. Au contraire, avec un vin rosé de même origine, provenant de la fermentation du jus de raisin séparé des râfles et des pellicules, le développement pondéral et l'indice de consommation des animaux ont été moins satisfaisants.

Il est donc possible que les pellicules (et les râfles) du raisin contiennent des substances atténuant l'action de l'alcool sur l'organisme.

2° Nous n'avons constaté l'existence d'aucune différence significative entre les effets généraux, sur l'organisme, de divers vins naturels de *Vitis vinifera* de même année, — Tuchan 1951 de macération complète et Carignan 1951 de macération complète, Tuchan 1952 de macération complète et Muscadet 1952 — , administrés aux mêmes doses et dans des conditions comparables.

3° Par contre, deux vins de Noah 1951 et 1952, comparés respectivement au vin de Tuchan de macération complète des deux mêmes années et au vin de Muscadet, ont donné, dans chaque cas, des résultats moins satisfaisants en ce qui concerne la vitesse de croissance.

4° Le sulfitage d'un vin de Muscadet (par addition de 400 mg de métabisulfite de potassium par hl) a eu des effets physiologiques défavorables. Avec le vin sulfité à l'avance, qui renferme SO_2 en partie à l'état combiné, la croissance est plus lente qu'avec le vin naturel. Avec le même vin sulfité au moment même de l'administration, qui contient SO_2 libre en plus grande quantité, la croissance est affectée plus fortement encore ; de plus, on note une hypertrophie très nette du foie.

5° Le traitement du même vin de Muscadet au ferrocyanure de potassium (à la dose de 8 g par hl) entraîne également des effets physiologiques défavorables : net ralentissement de la croissance, hypertrophie du foie et surtout des surrénales.

6° Un vin rouge naturel de Carignan, de macération complète, élaboré à partir de raisin de la récolte 1950 et âgé de un an et demi environ au début de l'expérience, exerce sur la croissance pondérale du Rat un effet défavorable, tandis qu'un vin de même nature, élaboré à partir de raisin de la récolte 1951 et âgé de 6 mois environ au début de l'expé-

rience, ne modifie pas la croissance. De même, un vin de Tuchan 1951, de macération complète, âgé de un an et demi au début de l'expérience, donne des résultats moins satisfaisants qu'un vin comparable de la récolte 1952, âgé de 6 mois environ au début de l'expérience. L'influence de l'âge — dans ces cas — semble défavorable.

Ces résultats montrent d'une façon certaine que tous les vins n'agissent pas de la même manière sur l'organisme. Ils confirment la nécessité d'une expérimentation prolongée avec collaboration de plus en plus étroite des nutritionnistes, des œnologues et des praticiens du vin (7).

BIBLIOGRAPHIE

(1) CASALE. — Cité par MARCARD (**16**).

(2) CHELLE, DUBAQUIÉ et TURBET. — Etude toxicologique sur le collage bleu. *Bull. Off. Int. Vin*, juillet 1935, p. 49.

(3) CORDONNIER (P.). — Le fer et ses origines dans le vin. *Ann. Technol. Agric.*, **2**, p. 1, 1953.

(4) FAGOUET (J.). — Au sujet du collage bleu. IIe Congrès National des Médecins Amis des Vins de France, p. 110, 1935.

(5) FLANZY (M.). — Le ferrocyanure de potassium et l'élimination du fer en œnologie. *C. R. Ac. Agric.*, **38**, p. 578, 1952.

(6) FLANZY (M.) et CAUSERET (J.). — Contribution à l'étude des boissons alcooliques. I. Etude comparée d'un vin et de l'alcool. *Ann. Technol. Agric.*, **1**, p. 227, 1952.

(7) FLANZY (M.), CAUSERET (J.) et HUGOT (D.). — Etat présent de nos connaissances sur l'intérêt alimentaire du vin. *Bull. Soc. Sc. Hyg. Alim.*, **42**, p. 84, 1954.

(8) FLAVIER (H.). — Evolution des vitamines B1 et B2 au cours de la maturation du raisin et de la fermentation alcoolique. *C.R. Soc. Biol.*, **130**, p. 499, 1939.

(9) GAUTRELET (G.). — Recherches sur l'action physiologique de l'acide sulfureux contenu dans les vins blancs. Rapport présenté à la Commission d'Etude, Bordeaux, 1910.

(10) GENEVOIS (L.) et RIBÉREAU-GAYON (J.). — Le vin. *Act. sc. et ind.*, n° 1017, 1947.

(11) GUERASSIMOF et VINOGRADAVA. — Les vitamines C dans le moût de raisin et le vin (en langue russe). *C.R. St. Vinicole Zonale de Crimée*, 1931 (d'après *Bull. Off. Int. Vin*, n° 48, 1931).

(12) JUGENDFEIN (K.). — Die Lebensstoffe und ihr Vorkommen in Fruchtsäften und Weinen. *Weinland*, **8**, p. 279, 1936.

(13) KRAMER (M.) et SATTERFIELD (G. H.). — Ascorbic Acid Content of Four Varieties of Red Wine. *Food Res.*, **7**, p. 127, 1942.

(14) LEOBARDY (M.). — Remarques sur l'alcoolisme en Limousin pouvant servir d'élément d'information dans la lutte contre l'alcoolisme. *Bull. Ac. Méd.*, **132**, p. 332, 1948.

(15) LEUCH, 1895. Cité par GAUTRELET (**9**).

(16) MARCARD (M.). — Le collage bleu. *Bull. Int. Vin*, **9**, p. 80, 1936.

(17) MERJANIAN (A.). — Teneur en vitamines du raisin et des vins (en langue allemande). *Ztschr. Untersuch. Lebensmtl.*, **52**, p. 307, 1926.

(18) MORGAN (A. F.), NOBLES (H. L.), WIENS (A.), MARSH (G. L.) et WINKLER (A. J.). — The B Vitamins of California Grape Juices and Wines. *Food Res.*, **4**, p. 217, 1939.

(19) NÈGRE (E.) et CORDONNIER (R.). — Ferrocyanure de potassium et phytate de calcium. *C.R. Ac. Agric.*, **38**, p. 346, 1952.
(20) PERLMAN (L.) et MORGAN (A. F.). — Stability of B Vitamins in Grape Juices and Wines. *Food Res.*, **10**, p. 334, 1945.
(21) SALVAREZZA (M.). — Clarification des vins par le ferrocyanure de potassium. *Ann. Chim. Appl.*, **24**, fasc. 9, 1934.
(22) VENEZIA (M.). — *R. Staz. sperim. Vitic. Enol. Connegliano Annuario*, vol. VIII, p. 67, 1937-1938.
(23) WILEY, 1907. Cité par GAUTRELET (**9**).

L'INOSITOL DANS LES RAISINS ET DANS LES VINS. SON DOSAGE MICROBIOLOGIQUE

PAR

E. PEYNAUD et Mlle S. LAFOURCADE

Station Agronomique et Œnologique de Bordeaux

La présence d'inositol a été signalée par HILGER, en 1871, dans le jus de raisin et particulièrement dans les baies à demi-mûres ; d'après cet auteur, cet alcool cyclique $(CHOH)_6$ est un constituant des vins naturels (1). MEILLÈRE (2), puis PERRIN (3) trouvent aussi de l'inositol dans tous les vins et FLEURY dans tous les vinaigres de vin (4). FELLENBERG (5) a donné une méthode de séparation. L'inositol a été identifié qualitativement par cristallisation directe et au moyen de la réaction de SCHERER (coloration rose développée en présence d'ammoniaque et de chlorure de calcium, après oxydation nitrique) ; mais on ne connaît pas les teneurs exactes que présentent les vins.

Le dosage chimique de l'inositol est en effet très difficile dans un milieu aussi complexe que le vin, contenant toujours des glucides. Il n'est pas possible de le séparer de ces derniers par des précipitations fractionnées ou des extractions. L'inertie chimique de l'inositol interdit un dosage simple et correct. Comme les sucres, l'inositol précipite par l'acétate de plomb en milieu ammoniacal, par la baryte en milieu alcoolique (1), par le mélange lait de chaux-sulfate de cuivre. Pour isoler l'inositol, FLEURY et JOLY (7), puis FLEURY et RECOULES (8) détruisent les glucides par un excès de magnésie à l'ébullition prolongée.

Mais il faut alors éliminer les produits de destruction des oses. Le dosage se termine par une oxydation periodique de l'inositol ; on détermine soit l'acide periodique réduit, soit, mieux, l'acide formique apparu, ou encore manométriquement le gaz carbonique dégagé pendant l'oxydation. Il y a quelques années, ces techniques n'avaient pas donné de bons résultats à l'un de nous, après de nombreux essais pour mettre au point les dosages de l'inositol et du mannitol dans les vins, du sorbitol dans les jus de fruits. Les produits de destruction alcaline des sucres ne peuvent être éliminés complètement ; les polyphénols viennent aussi

(1) L'inositol est éliminé au cours de la défécation préconisée pour le dosage du glycérol (6) et n'intervient pas dans ce dosage.

perturber le dosage. A cause de ces difficultés, on avait finalement renoncé à l'application des méthodes chimiques à ce problème.

L'inositol le plus répandu dans le règne végétal et celui qu'on trouve dans les vins, est l'isomère *méso*inositol (il y a 10 isomères possibles, dont 5 ont été trouvés dans la nature). Or, le mésoinositol est un facteur de croissance essentiel pour beaucoup de microorganismes, en particulier pour certaines levures. Les méthodes microbiologiques, d'application assez récente, permettent de résoudre élégamment son dosage.

Le premier dosage microbiologique du mésoinositol a été indiqué par WOOLLEY (9) en 1941. Cet auteur utilise une souche de *Saccharomyces cerevisiae*. A la même époque, WILLIAMS et ses collaborateurs (10) emploient également cette levure. En 1944, la méthode de WOOLLEY est modifiée par JURIST et FOY (11). Plus récemment WHITE et MUNNS (12) travaillent encore avec *Saccharomyces cerevisiae*. Plusieurs procédés mettant en œuvre d'autres levures ont été également publiés.

Saccharomyces carlsbergensis a été choisi par d'autres auteurs (13, 14, 15) de même que *Kloeckera brevis* (16, 17) ou *Schizosaccharomyces pombe* (17). Ces méthodes sont encore décrites ou signalées dans plusieurs monographies (18, 19, 20, 21).

Nous ne connaissons qu'un cas d'application au vin d'un dosage microbiologique de l'inositol. CASTOR (22), utilisant la méthode de BEADLE (23), avec *Neurospora crassa* « isonitolless », donne seulement deux chiffres pour un moût de raisin et le vin correspondant : 388 et 401 mg par litre. Selon nos informations, ces deux chiffres constitueraient toute la documentation quantitative actuelle sur la question.

Dans des études auxologiques que nous avons appliquées à plus d'une centaine de levures de vin, appartenant à divers genres et espèces (24), nous avons eu l'occasion de rencontrer des souches de levures ayant des exigences nettement marquées vis-à-vis d'une vitamine donnée et pouvant permettre, en conséquence, son dosage précis et spécifique. C'est ainsi que nous avons dosé par exemple l'acide pantothénique avec certaines souches de *Saccharomyces ellipsoïdeus*, et que nous avons établi les bases des dosages de la thiamine avec *Kloeckera magna*, de la pyridoxine avec une souche de *Saccharomyces uvarum*, de l'acide p. aminobenzoïque avec une souche de *Saccharomyces heterogenicus*. Par ailleurs toutes les souches de *Kloeckera apiculata*, levures apiculées extrêmement courantes dans le moût de raisin au début de la fermentation, étant auxohétérotrophes et exigeant le mésoinositol, peuvent servir d'organisme-test pour son dosage. Dans une étude semblable, VERONA (25) avait également fait remarquer que *Kloeckera apiculata*, moins exigeante en facteurs de croissance que *Kloeckera brevis*, se prête à une simplification de la méthode de Burkholder. Cependant, d'après LODDER et KREGER-VAN RIJ, il s'agirait d'une seule et même espèce (26). *Saccha-*

romyces veronae, Torulopsis bacillaris présentent les mêmes caractères d'hétérotrophie vis-à-vis du mésoinositol et peuvent également servir à son dosage.

Dans le tableau I, nous avons rassemblé quelques données relatives à la vitesse de multiplication de souches différentes de *Kloeckera apiculata*, lorsque manquent, individuellement, les diverses vitamines dans le milieu de culture. La croissance cellulaire est exprimée par néphélométrie. Elle est mesurée au troisième jour au photomètre à cellule photoélectrique. Les chiffres représentent la lumière transmise à travers la culture ; les chiffres les plus faibles correspondent donc aux troubles les plus intenses. On voit que lorsque manquent toutes les vitamines ou simplement le mésoinositol, la croissance est nulle. Le mésoinositol est donc absolument indispensable à ces levures. D'autre part, l'expérience montre que la croissance d'une souche de *Kloeckera apiculata* est, dans des conditions bien déterminées et entre certaines limites, proportionnelle à la concentration en mésoinositol du milieu de culture (voir tableau II et graphique I). Le dosage de ce corps est donc possible à l'aide de *Kloeckera apiculata*.

TABLEAU I

Croissance de diverses Kloeckera apiculata
en l'absence de certains facteurs de croissance

Pourcentage de lumière transmise à travers la culture de 3 jours. Mesures faites au photocolorimètre de JOUAN.

	Pomerol *a*	Pomerol *b*	Saint-Emilion *a*	Saint-Émilion *b*	Saint-Julien	Pauillac
Sans vitamine	100	100	100	100	100	100
Avec toutes les vitamines	56	34	44	45	60	48
Sans biotine	56	34	46	55	60	58
Sans pyridoxine	85	73	68	68	91	85
Sans thiamine	88	81	74	86	89	86
Sans acide pantothénique	97	99	70	99	88	88
Sans mésoinositol	100	100	100	100	100	100
Sans acide nicotinique	93	87	80	95	97	98
Sans acide p.-aminobenzoïque	52	40	50	70	62	56

MÉTHODE MICROBIOLOGIQUE DE DOSAGE DU MÉSOINOSITOL

a) **Milieu de base.** — Ce milieu doit être exempt de mésoinositol et, d'autre part, il doit être très riche en substances nutritives et autres facteurs de croissance des levures. Il ne faut pas que les éléments activants des milieux à doser, autres que le mésoinositol, viennent modifier

la courbe de croissance et ajouter leur effet à celui du mésoinositol à déterminer.

Le milieu de base suivant convient très bien à la culture de la plupart des levures ; il nous sert également pour le dosage des autres vitamines.

Glucose	50 g
Cendres de levures de boulangerie	6 g
Sulfate d'ammonium	1 g
Asparagine	3 g
Hydrolysat de caséine (1)	100 cm³
Acide citrique	6 g
Solutions de chacune des vitamines (2)	10 cm³

Compléter à 500 cm³ avec de l'eau bidistillée ; ajuster à pH 3,5 avec une solution concentrée de potasse.

Pour la préparation du milieu de base, on utilisera des produits très purs, ne risquant pas d'apporter des traces d'inositol. Pour la même raison, nous préférons utiliser des cendres de levure de boulangerie plutôt qu'un mélange de sels minéraux. La présence d'acide citrique se justifie pour tamponner le milieu ; nous préférons travailler à pH 3,5, voisin de l'acidité réelle des moûts et des vins ; d'autre part, on risque moins les contaminations bactériennes en milieu acide.

Tableau II

Exemple de l'établissement d'une courbe de croissance pour une gamme-étalon de concentrations en mésoinositol

Inositol en γ par tube	Pourcentages d'absorption lus à l'absorptiomètre				Densité optique correspondante (1)
	Série 1	Série 2	Série 3	Moyenne	
0	0	0	0	0	0
0,25	11	11	10	10,6	0,048
0,50	18	19	17	18	0,086
0,75	28	28	28	28	0,143
1,00	33	31	32	32	0,167
1,25	38	37	37	37,3	0,204
1,50	43	43	44	43,3	0,247
1,75	49	48	49	48,6	0,288
2,00	53	53	52	52,6	0,324
2,25	56	57	57	56,6	0,362
2,50	59	60	60	59,6	0,394

(1) Densité optique $= \log \frac{100}{\text{pourcentage de lumière transmise}}$.

(1) Préparation de l'hydrolysat de caséine. On mélange 200 g de caséine « exempte de vitamines » 170 cm³ d'acide chlorhydrique concentré et 100 cm³ d'eau bidistillée. On porte à l'autoclave pendant 40 minutes à 120°C. Après refroidissement, on neutralise exactement l'acidité par la soude en solution à 40 p. 100. On décolore avec 100 g de charbon activé. On filtre et on complète à un litre avec de l'eau bidistillée. On stérilise 15 minutes à 120°C pour la conservation qui se fait en glacière.

(2) Les solutions aqueuses de thiamine, pyridoxine, acide pantothénique, acide nicotinique, acide p. aminobenzoïque sont à 100 mg par litre ; la solution de biotine à 10 mg par litre. Ces solutions ne sont pas conservées plus de 2 semaines à la glacière.

b) **Préparation de la gamme étalon.** — Pour plus de sécurité, elle est réalisée en triple exemplaire. On utilise des tubes à essai de 16 × 16 calibrés, propres (lavés à l'acide sulfochromique), secs et stériles, qui reçoivent des quantités connues de mésoinositol, soit 0,25-0,50-0,75-1,00-1,25-1,50-1,75-2,00-2,25 et 2,50 γ, à l'aide d'une solution fraîchement préparée à 500 γ par litre. On complète le volume de chaque tube à 5 cm³ avec de l'eau bidistillée.

On verse en dernier lieu dans les tubes 5 cm³ du milieu de base. On bouche avec un tampon d'ouate et on agite pour homogénéiser. Chaque tube porte un numéro gravé.

c) **Préparation des tubes de dosage.** — On prévoit pour chaque vin à analyser deux séries de 4 tubes à essai également numérotés, qui reçoivent respectivement, dans les cas normaux, 1, 2, 3 et 4 mm³ de vin. Le vin a été préalablement dilué 1 000 fois avec de l'eau bidistillée. Pour des liquides ayant moins de 100 mg de mésoinositol par litre, on opérera sur des prises 10 fois plus fortes. On complète le volume de chaque tube à 5 cm³ avec de l'eau bidistillée et on verse ensuite 5 cm³ du milieu de base. On bouche de coton et on agite pour homogénéiser.

d) **Stérilisation et ensemencement.** — On passe les tubes-étalons et les tubes-dosages à l'autoclave à 110°C. On arrête le chauffage dès que cette température est atteinte et on refroidit le plus rapidement possible, en plongeant les tubes dans l'eau froide au sortir de l'autoclave.

La souche de *Kloeckera apiculata* servant au dosage est conservée en même temps sur moût de raisin non sulfité et sur moût gélosé. Les cultures sont repiquées tous les deux mois, les levures prélevées sur milieu solide étant portées sur milieu liquide et inversement. Dès que la croissance est obtenue, on place les tubes à la glacière. Pour la préparation de l'inoculum, on ensemence un tube de moût de raisin, conservé en bouteilles pasteurisées. Le levain ne doit pas avoir plus de 3 jours. On a intérêt à standardiser la préparation de l'inoculum pour obtenir des chiffres reproductibles. Comme pour tous les dosages de vitamines, la réussite du dosage dépend de l'ensemencement avec des cellules jeunes, prélevées dans la phase de multiplication logarithmique. On inocule chaque tube avec les précautions de stérilité nécessaires, avec une goutte d'une dilution au 1/200 d'un levain de 3 jours. Après ensemencement et bouchage d'ouate, chaque tube est agité en le roulant verticalement entre les mains, pour répartir les levures dans le milieu. L'ensemencement ainsi effectué donne une population de départ d'environ 2 000 levures au cm³.

e) **Incubation et mesure des troubles.** — Pour éviter les écarts de

température d'un tube à un autre, les tubes sont placés de préférence dans un récipient d'eau à l'étuve à 25°C. Les mesures des troubles peuvent être faites après une quarantaine d'heures. Nous utilisons l'absorptiomètre différentiel de DOGNON, avec l'écran rouge, les cultures étant placées en cuves de 1 cm d'épaisseur, après agitation pour mettre les levures en suspension. On calcule la densité optique correspondante. Avec ces valeurs, on trace une courbe standard pour les tubes de la gamme étalon. Cette courbe qui s'apparente assez bien à une droite (fig. 1), permet de calculer graphiquement les teneurs en mésoinositol des vins et des milieux étudiés. On dispose pour chacun d'eux de 2 ou 3 chiffres relatifs à des prises d'essai différentes. Le dosage est correct lorsque ces chiffres sont assez voisins ; on calcule la moyenne.

Pour les milieux colorés, il est nécessaire de garder un tube non ensemencé et resté limpide, qui servira pour le réglage au zéro de l'absorptiomètre.

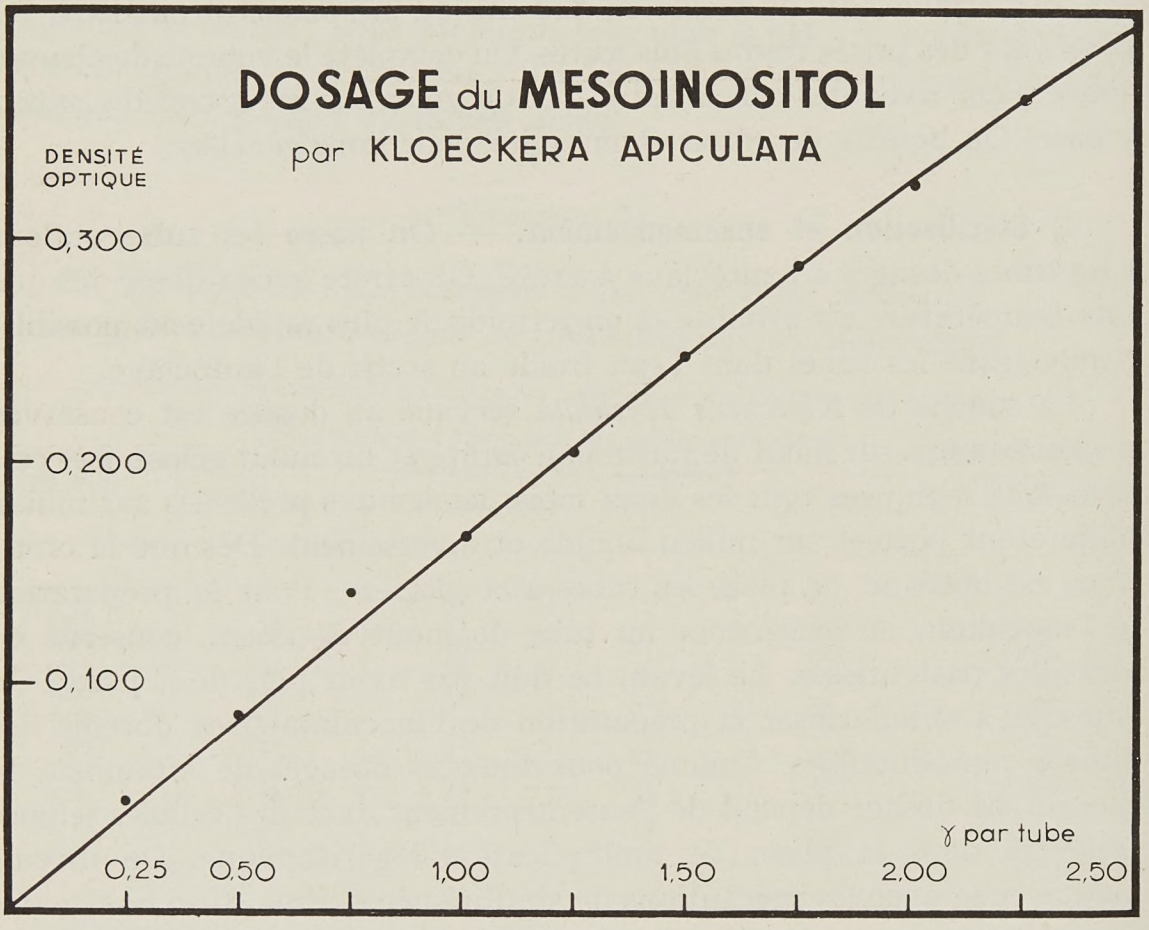


FIG. 1.

f) **Confirmation de la méthode.** — La méthode ainsi établie a été éprouvée de différentes façons. Malgré la grande spécificité des techniques microbiologiques, nous avons voulu nous assurer que nous ne dosions de cette façon que le mésoinositol. Puisque dans de rares vins, le mésoinositol étant fermenté (voir plus loin), il n'a pas été trouvé traces de

ce corps, il n'y a pas lieu de craindre que le dosage détermine en même temps un autre constituant du vin. D'autre part, nous avons séparé quantitativement l'inositol de quelques vins par précipitation plombique et nous avons effectué le dosage parallèlement sur le précipité et directement sur le vin. Le tableau ci-dessous donne ces résultats pour 4 vins, rouges et blancs, secs ou peu sucrés ; la technique de précipitation est en effet déficitaire pour des vins très sucrés. On opérait la précipitation de la façon suivante : 10 cm³ de vin sont déféqués par 2 cm³ d'acétate neutre de plomb qui n'entraîne pas de mésoinositol. Après quelques heures de repos, on centrifuge. 6 cm³ de ce liquide correspondant à 5 cm³ de vin, reçoivent 2 cm³ d'ammoniaque au tiers et 1 cm³ de sous-acétate de plomb. On attend quelques heures, on centrifuge, et lave le précipité 3 fois à l'eau ammoniacale. On le redissout à chaud dans l'acide sulfurique N/10 et on complète à 50 cm³ ; on sépare le sulfate de plomb précipité.

	Dosage direct	Dosage sur le précipité
	—	—
Pauillac	400	390
Lalande de Pomerol	360	370
Entre-Deux-Mers sec	360	360
Entre-Deux-Mers demi-sec	420	430

On voit que la correspondance des résultats est très bonne ; on peut donc opérer directement sur le vin.

Nous avons vérifié par ailleurs qu'une addition de mésoinositol à un vin se retrouvait exactement au dosage ; lorsqu'on opère comparativement, la précision est grande et atteint quelque p. 100. Mais il arrive que la reproductibilité des résultats, lorsqu'on recommence le dosage à quelques jours d'intervalle, est moins bonne. C'est du reste le défaut habituel des techniques microbiologiques. On réduit beaucoup les écarts, en opérant avec des levures très jeunes, repiquées plusieurs fois dans leur phase de multiplication, et en normalisant la préparation des inoculums et l'ensemencement.

L'INOSITOL DANS LES RAISINS ET LES MOUTS

Nous avons suivi l'inositol dans le jus de raisin, de la véraison à a maturité, à la récolte 1954, en opérant le dosage aussitôt après l'obtention du jus frais par pressurage. Les analyses ont porté sur les raisins des cépages rouges Merlot et Cabernet-Sauvignon, prélevés dans trois vignobles situés à Pauillac (Médoc), Pessac (Graves) et Saint-Emilion. Ayant observé la grande résistance de l'inositol à la stérilisation à chaud et à la conservation, des dosages ont été encore effectués sur des moûts de 1953 conservés en bouteilles pasteurisées depuis la récolte.

Les tableaux ci-dessous donnent les résultats obtenus, les teneurs étant exprimées en mg par litre de jus (tableau III) et calculées pour 1 000 grains de raisin (tableau IV). En 1953, la demi-véraison, époque où la moitié des grains ont changé de couleur, a été fixée au 9 août pour le Cabernet, au 17 août pour le Merlot ; plus tardive en 1954, elle se situe vers le 28 août pour les deux cépages. Le dernier prélèvement correspond à la complète maturité.

Dans le jus, les teneurs en inositol augmentent de la véraison à la maturité, mais de façon irrégulière, car elles subissent les fluctuations du volume du grain et de son rendement en jus. A la maturité les teneurs

TABLEAU III

Evolution de l'inositol au cours de la maturation

Teneurs en mg par litre de jus de raisin.

	1953	13 août	24 août	3 sept.	14 sept.	21 sept.	28 sept.	5 octobre
Pauillac	Merlot	280	540	520	480	430	450	520
	Cabernet-Sauvignon	470	500	660	600	610	550	640
	1954	23 août	2 sept.	13 sept.	22 sept.	30 sept.	7 octobre	14 octobre
Pauillac	Merlot	220	230	270	260	300	240	330
	Cabernet-Sauvignon	270	290	320	400	410	380	400
Pessac	Merlot	260	320	260	260	310	340	—
	Cabernet-Sauvignon	270	320	320	290	430	460	—
Saint-Emilion	Merlot	220	330	260	270	280	280	420
	Cabernet-Sauvignon	300	460	360	420	360	370	450

varient de 330 à 640 mg, elles sont toujours un peu plus élevées pour le Cabernet-Sauvignon que pour le Merlot. Les raisins ayant été ramassés à Pauillac de la même façon en 1953 et en 1954, sur les mêmes rangées de vigne, les résultats sont comparables et on voit qu'en 1953 les quantités d'inositol sont beaucoup plus fortes qu'en 1954.

L'accumulation continue de l'inositol dans le grain de raisin se distingue mieux dans le tableau IV. L'inositol fait plus que doubler, de la véraison à la maturité. Il y a donc apport régulier d'inositol dans le fruit qui mûrit. Ces observations, qu'on retrouve pour les deux cépages dans des situations différentes, vont à l'encontre de ce qu'avaient avancé les premiers auteurs. D'après MAQUENNE (27), l'inositol diminue sensi-

TABLEAU IV

Evolution de l'inositol au cours de la maturation

Teneur en mg pour 1 000 grains de raisin.

	1953	13 août	24 août	3 sept.	14 sept.	21 sept.	28 sept.	5 octobre
Pauillac	Merlot	100	250	260	360	370	400	420
	Cabernet-Sauvignon	180	240	370	320	300	310	320
	1954	23 août	2 sept.	13 sept.	22 sept.	30 sept.	7 octobre	14 octobre
Pauillac	Merlot	90	140	190	200	220	190	200
	Cabernet-Sauvignon	100	150	200	230	220	220	230
Pessac	Merlot	120	190	200	190	250	270	—
	Cabernet-Sauvignon	130	170	200	190	240	310	—
Saint-Emilion	Merlot	130	230	230	220	240	240	290
	Cabernet-Sauvignon	100	160	180	220	180	200	230

blement dans les fruits jeunes au cours de la maturation ; MEILLÈRE (2) le trouve généralement en moindre quantité dans les fruits mûrs que dans les fruits verts. Sans vouloir généraliser avant d'avoir étendu cette étude à d'autres fruits, on peut penser que ces contradictions viennent du fait que les méthodes d'extraction et de cristallisation des auteurs avaient un meilleur rendement pour les fruits verts que pour les fruits riches en sucres.

Nous avions commencé à établir une documentation sur la richesse des moûts en inositol, mais nous avons observé que l'inositol ne varie pas pendant la fermentation. Les vins présentent exactement les mêmes teneurs que les moûts dont ils proviennent. Aussi avons-nous surtout rassemblé des documents sur les vins. Voici pour 5 moûts résultant d'un mélange de divers cépages de la récolte 1954, les résultats des dosages effectués avant et après fermentation :

	Moût	Vin correspondant
	—	—
Cénac 1	600	600
Cénac 2	490	490
Barsac (pourriture noble)	710	710
Pomerol	490	490
Saint-Emilion	380	380

Les besoins en inositol des levures sont en effet très faibles ; ils sont inférieurs à 500 γ par litre pour les levures les plus exigeantes. Il est évident qu'une quantité aussi minime n'affecte pas la teneur du moût.

En somme les moûts ont 1 000 fois plus d'inositol qu'il est nécessaire à la bonne croissance des levures. C'est également ce qu'avait observé CASTOR (22).

L'INOSITOL DANS LES VINS

Nous avons d'abord étudié quelle était l'incidence des conditions de vinification sur l'inositol des vins, puis nous avons rassemblé une abondante documentation sur les taux que présentent les vins de Bordeaux ; enfin, nous avons examiné l'influence de divers traitements des vins.

a) **Relation avec les conditions de vinification.** — Nous avons dosé l'inositol dans les vins provenant des essais de vinification conduits par J. et P. RIBÉREAU-GAYON, dans la cuverie expérimentale de la Station Œnologique, à Saint-Caprais, aux vendanges 1952, 1953 et 1954 (28). Rappelons que l'installation de cette cuverie permet l'homogénéisation parfaite d'un volume important de vendange foulée, la séparation de la phase liquide de la phase solide par égouttage et la répartition exacte dans les cuves de fermentation, par mesures des volumes et pesées, des mêmes quantités de jus et de marc. La matière première étant ainsi homogène, la disposition des cuves permet d'étudier toutes les conditions possibles de vinification.

Il est apparu que le mode de vinification influe assez peu sur la teneur en inositol et nous ne donnerons pas ici le détail des chiffres, assez semblables. Le fait de conduire la fermentation en cuves ouvertes ou fermées, avec chapeau flottant, avec chapeau immergé ou avec lessivage automatique, en cuve ouverte ou fermée, avec ou sans remontage d'aération, avec ou sans anhydride sulfureux, à température inférieure ou supérieure à 25°C, n'influe pratiquement pas sur le taux d'inositol des vins. En réalité, la pellicule du raisin ne semble pas contenir davantage d'inositol que le jus, et l'importance de la macération et la durée de la cuvaison n'en modifient pas la teneur. De même, aux écoulages le vin de presse a exactement le même taux que le vin de goutte.

Cependant la rafle paraît être la source d'une petite quantité supplémentaire d'inositol dans les vendanges non éraflées, ainsi que le montrent les résultats suivants :

	Avec rafle	Sans rafle
Cuvaison courte 1953	38o	35o
Cuvaison longue 1953	38o	33o
Cuvaison longue 1952	37o	32o

La modification est si faible qu'on peut garder comme conclusion l'indépendance du taux de mésoinositol avec le mode de vinification.

b) **Documentation sur les teneurs en inositol des vins de Bordeaux.** — Nos analyses ont porté sur 88 vins de Bordeaux, 31 vins blancs et 57 vins rouges de provenance connue. Les tableaux V et VI reproduisent les résultats.

TABLEAU V

Teneurs en inositol des vins blancs de Bordeaux

Exprimées en mg par litre

Appellation et origine du vin	Observations	Inositol
Bordeaux 1953	10° sec	220
Bordeaux 1953	12° sec	330
Bordeaux 1953	10° + 27 g sucre	510
Bordeaux	10° + 1°	240
Bordeaux	10° + 1° 5	300
Bordeaux supérieur	11° 5 + 1° 5	480
Bordeaux supérieur		490
Bordeaux supérieur		440
Entre-Deux-Mers 1953	12° 6 sec	460
Entre-Deux-Mers 1953	13° 5 sec	370
Premières Côtes de Bordeaux 1954	sec	640
Premières Côtes de Bordeaux 1954	sec	680
Premières Côtes de Bordeaux 1954	12° 0 + 1°5	600
Premières Côtes de Bordeaux 1954	11°5 + 1°0	490
Premières Côtes de Bordeaux 1950	13°0 + 2°8	490
Graves		430
Graves supérieures		400
Côtes de Montravel (Dordogne)		490
Loupiac 1950		480
Loupiac 1952		380
Sainte-Croix-du-Mont 1953	13°5 + 1°5	560
Sainte-Croix-du-Mont 1953	14°2 + 2°5	570
Sainte-Croix-du-Mont 1953	14°5 + 3°1	700
Cérons		470
Barsac		570
Barsac 1947		600
Barsac 1949		620
Barsac 1950		590
Barsac 1954		710
Fargues 1950		390
Sauternes		730

Les teneurs des vins blancs varient de 220 à 730 mg, soit du simple au triple, avec une moyenne générale de 497 mg. On peut remarquer que ce sont les vins les plus riches en alcool et en sucre qui sont aussi les plus riches en inositol, mais cette loi n'est nullement générale et on rencontre parmi les vins de petit degré des teneurs assez élevées et parmi les vins liquoreux des chiffres très inférieurs à la moyenne.

Les taux présentés par les vins rouges ont varié de 0 à 290 mg, avec une moyenne générale de 334 mg. Une série de vins ayant 40 à 50 ans de bouteille accusent des quantités très faibles, inférieures à 100 mg par litre, et, fait inattendu, 2 vins du Médoc et 2 vins de presse de la récolte 1953 n'ont plus trace d'inositol. Cependant ces vins sont sains, bien qu'ils montrent des bactéries à l'examen microscopique, et

TABLEAU VI

Teneurs en inositol des vins rouges de Bordeaux

Exprimées en mg par litre

Appellation et origine du vin	Inositol
Vins très vieux :	
Cantenac 1899	19
Margaux 1899	15
Cantenac 1920	420
Pauillac 1900	38
Pauillac 1911	100
Vins de crus :	
Chateau L. Pauillac :	
1934	280
1945	400
1947	380
1949	320
1950	330
1953	0
Château L. B. Pauillac :	
1938	410
1940	120
1942	430
1943	590
1945	510
1947	520
Château P. Margaux :	
1952	300
1953	0
1954	510
Château B. Saint-Julien :1953	370
Château F. Saint-Emilion :	
1951	420
1952	440
1953	280
Château CF. Saint-Emilion :	
1952	440
1953	410
Château P. Saint-Emilion 1953	330
Château PC. Pessac 1952	450
Saint-Caprais :	
1952	320
1953 lot 1	340
1953 lot 2	300
1954	510

Appellation et origine du vin	Inositol
Vins de presse :	
Margaux 1954, vin de goutte	510
Margaux 1954, vin de presse	510
Cantenac 1953, vin de goutte	290
Cantenac 1953, vin de presse	0
Pessac 1953, vin de goutte	440
Pessac 1953, vin de presse	0
Appellations en bouteilles :	
Bordeaux	290
Bordeaux-clairet	240
Premières côtes de Blaye	430
Côtes de Bourg	330
Premières côtes de Bordeaux 1949	400
Côtes de Fronsac	400
Côtes de Canon-Fronsac 1943	230
Puisseguin-Saint-Emilion	350
Lussac-Saint-Emilion	340
Montagne-Saint-Emilion	300
Saint-Georges-Saint-Emilion	280
Sables-Saint-Emilion	290
Lalande de Pomerol	350
Pomerol	430
Médoc 1948	440
Haut-Médoc	370
Saint-Estèphe	300
Margaux	260
Pauillac 1949	400

leur acidité volatile ne dépasse pas 0,60. Ils proviennent de crus réputés et leur dégustation est parfaite ; l'un d'eux est considéré comme un des meilleurs vins du millésime 1953. Il est vraisemblable qu'ici l'inositol a disparu par fermentation microbienne, parallèle ou consécutive à la fermentation malolactique. Bien que ces faits n'aient jamais été signalés, on peut penser qu'il existe des bactéries du vin capables d'attaquer l'inositol. La destruction de l'inositol est courante dans le métabolisme

bactérien, en particulier avec des *Lactobacillus* (29, 30) et avec *Aerobacter aerogenes* (31).

Une attaque limitée paraîtrait même assez fréquente dans les vins rouges. En effet, si l'on excepte dans le calcul de la moyenne les cas particuliers de vins très pauvres en inositol, on s'aperçoit que les vins rouges ont malgré tout toujours moins d'inositol que les vins blancs, puisque la nouvelle moyenne est de 372 mg au lieu de 497 mg pour ceux-ci. Cette différence peut provenir pour une part de ce que les vins blancs liquoreux sont issus de moûts concentrés par la pourriture noble, mais aussi certainement d'une activité microbienne dans les vins rouges avec attaque partielle de l'inositol, qui est impossible dans les vins blancs sulfités.

Ces chiffres soulèvent donc une hypothèse qui demande confirmation par d'autres recherches. L'attaque bactérienne de l'inositol est du reste démontrée par le fait que les vins atteints de la maladie de la tourne d'une manière assez avancée, ayant des acidités volatiles supérieures à 1,20 g, n'ont plus d'inositol.

En définitive, l'inositol est un important constituant du vin, puisqu'avec un demi-gramme et plus par litre, il se montre aussi abondant que certains constituants mieux connus, comme par exemple l'acide acétique, l'acide citrique, le 2,3 butanediol ou même le potassium. A ces doses, l'inositol est évidemment plus qu'un facteur de croissance et qu'une vitamine. Sauf cas exceptionnel, il y en a toujours infiniment plus qu'il n'est besoin pour assurer la croissance maximum des levures et des bactéries.

Le mésoinositol a été classé dans le groupe des vitamines B ; son rôle chez les animaux supérieurs n'a pas été encore parfaitement dégagé, sinon pour montrer qu'il intervient dans un grand nombre de processus physiologiques. Du point de vue nutritionnel, le taux d'inositol des vins n'est pas négligeable. On a considéré que dans une ration équilibrée de 2 500 calories, il y a environ 1 g d'inositol principalement apporté par les végétaux. Avec 0, 5 g d'inositol pour 600 calories environ, le vin apparaît comme un aliment riche en inositol.

c) **Influence des divers traitements des vins sur la teneur en inositol.** — L'inositol est une molécule très stable, de faible affinité chimique, résistant bien aux traitements physiques, au chauffage, à l'oxydation. En fait les traitements du vin, tels que filtration, collages avec des colles organiques (gélatine, albumine, etc.) ou minérales (bentonite), pasteurisation, oxygénation, sulfitage, ne modifient pas la teneur en inositol du vin. Le traitement par échangeurs d'ions, par passage successif sur colonnes de résines cationiques puis anioniques, ne touche pas non plus à ce corps, ce qui est logique en raison de sa neutralité chimique. Parmi les collages chimiques, l'un d'eux, d'application récente, était particu-

lièrement intéressant à étudier, puisqu'il met en œuvre les sels de l'ester hexaphosphorique de l'inositol : c'est le traitement au phytate de calcium utilisé pour déferriser les vins.

Nous avons traité des vins blancs avec une série de produits différents : sels de calcium, de sodium, sel double de calcium et de magnésium de l'acide phytique, son de blé qui agit également par sa richesse en phytate. Les traitements furent faits à la dose théorique, calculée d'après la teneur en fer des vins, et à la dose double. L'inositol a été dosé après filtration. Les résultats présentent des irrégularités, mais il n'est pas possible de mettre en évidence une augmentation systématique du taux d'inositol. On sait qu'il reste toujours dans le vin après ce traitement, surtout à dose élevée, une certaine proportion d'acide phytique. Mais les esters phosphoriques d'inositol n'exercent pas le rôle de facteur de croissance et *Kloeckera apiculata* ne réagit pas à leur présence. L'hydrolyse de ces composés dans le vin serait donc pratiquement nulle.

En résumé, le taux d'inositol des vins ne paraît pas être modifié par les traitements de clarification et de stabilisation qu'ils subissent, mais il peut diminuer, dans les vins non sulfités, sous l'influence de certaines bactéries lactiques.

CONCLUSIONS

L'inositol est connu comme un constituant des vins depuis plus d'un demi-siècle, mais les méthodes chimiques de dosage de ce corps n'ayant pu être appliquées au jus de raisin et au vin, on ne connaissait pas sa concentration exacte dans ces milieux.

A l'aide de *Kloeckera apiculata* isolées de moûts de raisin, levures auxohétérotrophes nécessitant absolument le mésoinositol pour leur croissance, il nous a été possible de mettre au point une technique de dosage sensible et spécifique. *Saccharomyces veronae*, *Torulopsis bacillaris*, pourraient servir au même dosage.

Appliquée au raisin durant sa maturation, cette technique a montré que l'inositol, contrairement à ce qu'avaient affirmé les premiers auteurs se limitant à des observations qualitatives, ne cesse de s'accumuler dans le grain de raisin, où sa teneur fait plus que doubler en 45 jours.

La fermentation alcoolique pure ne modifie pas cette concentration, mais dans les vins non sulfités, l'inositol peut baisser, et exceptionnellement jusqu'à 0, sous l'action des bactéries lactiques. Dans la documentation rassemblée, les teneurs vont de 220 à 730 mg pour les vins blancs avec moyenne de 497 mg et de 0 à 590 mg pour les vins rouges, avec moyenne de 334 mg.

Par ailleurs, l'inositol est stable et n'est pas modifié par les traitements habituels de clarification et de stabilisation des vins.

BIBLIOGRAPHIE

(1) HILGER (A.). — Neues Vorkommen des Inosites im Planzenreich und Ueberführung desselben in Paramilchsäure. *Ann. Chem. Pharm.*, **160**, 333-337, 1871. *Ann. Œnologie*, **3**, 89-91, 1873.

(2) MEILLÈRE (G.). — L'inosite dans le règne organique et en particulier dans les drogues simples et composées. Rôle biochimique de l'inosite. *Journ. Pharm. Chim.*, **28**, 289, 1908.

(3) PERRIN (G.). — Présence et recherche de l'inosite dans les vins naturels. *Ann. Chim. anal.*, **14**, 182, 1909.

(4) FLEURY (P.). — Application de la recherche de l'inosite à la caractérisation des vinaigres de vin. *Journ. Pharm. Chim.*, **2**, 264, 1910.

(5) FELLENBERG (Th. von). — *Mitt. Lebensmittel Hyg.*, **3**, 220, 1912.

(6) PEYNAUD (E.) et CHARPENTIE (Y.). — Dosage colorimétrique du glycérol dans les moûts et les vins liquoreux. *Ann. Falsif. Fraudes*, **47**, 85-90, 1954.

(7) FLEURY (P.) et JOLY (M.). — Séparation de l'inositol d'avec le glucose et dosage. *Journ. Pharm. Chim.*, **26**, 341-353 et 397-408, 1937.

(8) FLEURY (P.) et RECOULES (A.). — Dosage chimique de l'inositol en présence de glucides. *Bull. Soc. Chim. biol.*, **31**, 256-264, 1949.

(9) WOOLLEY (D. W.). — A method for the estimation of inositol. *Journ. biol. chem.*, **140**, 453, 1941.

(10) WILLIAMS (R. J.), STOUT (A. K.), MITCHELL (H. K.) et Mc MAHAN (J. R.). — Assay method for inositol. *Univ. Texas Pub.*, nº 4137, 27-30, 1941.

(11) JURIST (V.) et ROY (J. R.). — A microbiological assay of inositol. *Journ. Bact.*, **47**, 434, 1944.

(12) WHITE (J.) et MUNNS (D. J.). — Occurence and estimation of vitamins essential to the growth of yeasts. *Amer. Brewer*, **86**, 29-32, 1953.

(13) SONNE et SOBOTKA. — *Archiv. Biochem.*, **14**, 93, 1947.

(14) ATKIN (L.), WILLIAMS (W. L.), SCHULTZ (A. S.) et FREY (C. N.) d'après GYORGY (P.). — Vitamin methods, *Acad. Press*, New-York, 445, 1951.

(15) SNELL (E. E.). — in The Vitamins, Acad Press, New-York, 361, 1954.

(16) BURKHOLDER (P. R.), Mc VEIGH (I.) et MOYER (D.). — Studies of some growth factors of yeasts. *Journ. Bact.*, **8**, 385-390, 1944.

(17) NORTHAM (C. E.) et NORRIS (F. W.). — A microbiological assay of inositol : its development and statistical analysis. *Journ. gen. Microbiol.*, **7**, 245-256, 1952.

(18) CONNOR JOHNSON (B.). — Methods of vitamin determination. Burgess Pub. Co, Minneapolis, 1948.

(19) FLEURY (P.) et BALATRE (P.). — Les inositols, Masson et Cie, Paris, 1947.

(20) SCHOPFER (W. H.). — Le mésoinositol en biologie. IIe Journées Biochimiques Franco-Suisses, mai 1951.

(21) WELSCH (M.). — Le dosage microbiologique des vitamines, Masson éd., Paris, 1947.

(22) CASTOR (J. G. B.). — The B. complex vitamins of musts and wines as microbial growth factors. *Applied. Microb.*, **1**, 97-102, 1953.

(23) BEADLE (G. W.). — An inositolless mutant strain of *Neurospora* and its use in bioassays. *Journ. biol. chem.*, **156**, 683-689, 1944.

(24) PEYNAUD (E.) et LAFOURCADE (S.). — Etudes récentes de la Station Œnologique de Bordeaux sur les facteurs de croissance. *Xe Congrès intern. Ind. agric. alim.*, Madrid, 1954.

LAFOURCADE (S.). — Contribution à l'étude des activeurs et des inhibiteurs de la fermentation alcoolique des moûts de raisin. Thèse Ingénieur-Docteur, Bordeaux, 1955. *Ann. Technologie*, **4**, 283, 1955.

(25) VERONA (O.). — Qualche ricerca auxologica sopra i lieviti con particolare riferimento a quelli della fermentazione vinaria. *Annali Facolta agraria Pise*, **12**, 105-115, 1951.
(26) LODDER (J.) et KREGER-VAN RIJ (N. J. W.). — The Yeasts. Nth Holland Plubis. Co, Amsterdam, 1952.
(27) MAQUENNE (M.). — Sur un nouveau sucre à noyau aromatique. *C.R. Acad. Sci.*, **109**, 812-814, 1889.
(28) RIBEREAU-GAYON (J.) et RIBEREAU-GAYON (P.). — Etude expérimentale de la vinification en rouge. *Chimie et Industrie*, **70**, 426 et 694, 1953 et **72**, 922, 1954.
(29) HEWIH (J. A.) et STEABBEN (P. B.). — Note on the fermentation of i-inositol *Biochem. Journ.* **15**, 665, 1921.
(30) KUMAGAWA (H.). — Uber die Zerlegung des meso-Inosits und Glycerins nach Art der wahren Zucker durch den Bacillus lactis aerogenes. *Biochem. Zeits.*, **131**, 157-160, 1922.
(31) MAGASANIK (B.). — The pathway of inositol fermentation in Aerobacter aerogenes. *Journ. Amer. Chem. Soc.*, **73**, 5919, 1951.

LA DÉTERMINATION CHIMIQUE DU DEGRÉ ALCOOLIQUE DU VIN, PAR LE MÉLANGE SULFO-CHROMIQUE

PAR

Michel FLANZY, Mme L. BOUZIGUES et Henri BOUZIGUES

Station Centrale de Recherches sur l'Œnologie, la Cidrerie et les Jus de Fruits, Narbonne

INTRODUCTION

L'oxydation de l' Éthanol par le mélange sulfo-chromique, fut étudiée en 1929 par Lucien SEMICHON et l'un de nous dans des conditions bien déterminées qui leur permirent d'en déduire une méthode de détermination chimique du degré alcoolique des vins (1) d'une rapidité et d'une précision satisfaisantes.

Par la suite, leur mode opératoire fut repris par d'autres auteurs qui s'efforcèrent, avec plus ou moins de bonheur, d'y apporter quelques perfectionnements. Citons pour mémoire, AGABALIANTZ (2) qui, en 1931, préféra recourir à l'iodométrie, pour doser l'excès d'oxydant. D'autres conservèrent le mode de titrage initial du bichromate, mais modifièrent les concentrations des réactifs et donnèrent la préférence à un indicateur interne d'oxydo-réduction, pour sensibiliser le virage. Ce sont, par ordre chronologique, en 1941, JOSLYN et AMERINE (3) d'une part, et FESSLER (4) d'autre part ; ZIMMERMAN et FESSLER en 1949 (5) ensuite, en 1951, AMERINE et JOSLYN (6) et enfin, plus récemment, P. JAULMES, DIEUZEIDE et Mlle HAMELLE (7) en 1953.

Étudiant ces divers modes opératoires, nous avons expérimenté un nouveau procédé, qui, tout en conservant les conditions initiales d'oxydation de l'éthanol facilite le titrage final et diminue les erreurs de manipulation. C'est, en somme, une synthèse de toutes les améliorations apportées à la technique initiale, fruit d'une longue expérience, et pour laquelle nous avons étudié l'emploi comme indicateur d'oxydo-réduction, du diphényl amino sulfonate de baryum.

I. — PROCÉDÉ SEMICHON ET FLANZY

1. Aperçu sur le procédé initial

Il est basé sur l'oxydation à froid de l'éthanol suivant l'équation :

$$2\ Cr_2O_7K_2 + 8\ SO_4H_2 + 3\ CH_3 — CH_2OH \rightarrow$$
$$3\ CH_3COOH + 2\ (SO_4)^3Cr_2 + 2\ SO_4K_2 + 10\ H_2O$$

suivant laquelle 138,14 g d'éthanol réduisent exactement 588,42 g de bichromate de potassium.

Le mode opératoire était le suivant : On prélève 20 ml de vin que l'on étend à 50 ml par de l'eau distillée bouillie dans un ballon à distillation de 100 ml. On distille et les vapeurs passant dans un petit réfrigérant sont condensées et recueillies dans une fiole jaugée de 100 ml renfermant 5 ml d'eau distillée et dans laquelle plonge un tube effilé prolongeant le réfrigérant. Après distillation d'un peu plus de la moitié du liquide, on arrête l'opération et l'on complète le liquide de la fiole jaugée à 100 ml avec de l'eau distillée à 15°C.

On exécute l'oxydation sur 5 ml de ce distillat correspondant à 1 ml de vin dans un Erlenmeyer dans lequel se trouvent 20 ml de solution de bichromate de potasse à 33,832 g par litre de sel et 10 ml d'acide sulfurique à 66° B, préalablement refroidis à la température du laboratoire. Après 10 minutes de réaction entre le distillat et le mélange oxydant soigneusement homogénéisés par agitation, on titre l'excès d'oxydant par une liqueur de sel de Mohr 2 fois plus diluée par rapport à la liqueur oxydante qui sert d'étalon. Le point équivalent est déterminé à l'aide d'une solution de ferricyanure de potassium employée comme réactif externe (procédé à la touche), ou comme réactif interne. Si le vin renferme plus de 500 mg de SO_2 par litre, il sera préalablement distillé (8). Le degré alcoolique est donné par la formule :

$$D = 20 - \frac{n}{2}$$

n représente le nombre de ml de liqueur réductrice correspondant à l'excès de liqueur oxydante.

2. Étude des modifications qu'il a subies

La plus ancienne est celle d'AGABALIANTZ (*op. cit.* (2)) qui, dès 1931, tout en conservant les conditions d'oxydation de SEMICHON et FLANZY, donnait la préférence à l'iodométrie pour le titrage de l'excès d'oxydant. Pour cet auteur, l'oxydation doit être exécutée à 18°C, car au-dessous de cette température, il a constaté que la réaction risquait

de ne pas être complète. Sa solution oxydante renferme 33,638 g de bichromate au litre et correspond au degré alcoolique exprimé en pour cent en volume 20°C/20°C. De plus, il prélevait 25 ml de vin et portait le distillat correspondant à 250 ou 500 ml suivant que la richesse alcoolique était inférieure ou supérieure à 15° en volume. On titre ensuite l'excès d'oxydant après dilution, par une solution décinormale de thiosulfate en présence de IK et d'empois d'amidon. JOSLYN et AMERINE (*op. cit.* (3) et (6)), puis FESSLER et ZIMMERMAN (*op. cit. op. cit.* (4) et (5)) modifièrent les conditions initiales des réactifs et utilisèrent comme indicateur d'oxydo-réduction, l'ortho-phénanthroline ferreuse pour évaluer l'excès d'oxydant par la liqueur réductrice de sel de Mohr.

P. JAULMES dans ses deux traités d'analyse des vins, donna longtemps la préférence à l'oxydation nitro-chromique de CORDEBARD à cause de la régularité de la réaction d'oxydation et surtout de la commodité de l'iodométrie utilisable dans ces conditions sans difficulté. Par la suite, cet auteur s'aperçut de la grande différence de dilatabilité du mélange nitro-chromique et de la solution aqueuse de thiosulfate qui l'obligeait à de fréquents titrages de ces deux liqueurs et annihilait les avantages de stabilité de ces solutions. De plus, la présence d'acide nitrique rend difficile, sinon impossible, un titrage ultérieur de l'acide acétique formé. Il donne donc la préférence au mélange sulfo-chromique de SEMICHON et FLANZY et apporta en 1953 avec J. C. DIEUZEIDE et Mlle HAMELLE (*op. cit.* (7)) de nouvelles modifications en tenant compte des travaux américains.

Les variantes importantes au procédé initial sont les suivantes :

1° On mesure un volume minimum de distillat à oxyder de 10 ml au lieu de 5, ce qui augmente la précision relative de la mesure.

2° L'emploi de liqueur oxydante de 33,791 de $Cr_2O_7K_2$ au lieu du titre de 33,832 qui tient compte de la vraie valeur de la densité absolue à 15°C de l'éthanol pur. L'acide sulfurique est dilué à demi, ce qui évite de refroidir le mélange sulfo-chromique et accélère la vitesse de réaction d'oxydation au début, et évite les risques d'oxydation d'acide acétique, même après une semaine de contact. La durée de la réaction est de 30 minutes.

3° L'emploi d'un indicateur interne d'oxydo-réduction : l'ortho-phénanthroline ferreuse proposé par JOSLYN et AMERINE (*op. cit.* (3)).

4° L'évaluation de l'excès d'oxydant par le procédé en double retour par une liqueur titrée de permanganate ajustée pour que 10 ml de cette solution corresponde à 1 ml de liqueur ferreuse. La précision du titrage est plus élevée et le virage plus net.

II. — CRITIQUE DE CES DIVERS MODES OPÉRATOIRES

1. Substances oxydables autres que l'éthanol entraînées dans le distillat

L'acétaldéhyde donne une demi-erreur, comme l'ont fait remarquer SEMICHON et FLANZY, car il consomme moitié moins d'oxydant que l'éthanol. Cependant, on rencontre dans les vins de 5 à 50 mg par litre de ce corps, soit au maximum 50 γ dans la prise d'essai. Dans le cas d'un vin de 10° renfermant 79 mg d'éthanol dans un millilitre, l'erreur peut être négligée car la quantité d'oxydant consommée est plus de deux mille fois plus faible pour l'acétaldéhyde que pour l'alcool.

L'alcool méthylique se trouve dans les vins à des doses comprises entre 50 et 200 mg par litre (FLANZY (10), BERTRAND et SILBERSTEIN (11)). Comme il ne peut être séparé dans la distillation simple, il se retrouve intégralement dans le distillat. Un vin de 10° contenant 200 mg par litre de méthanol renferme 200 γ de ce corps dans une prise d'essai d'un millilitre, s'oxydant suivant l'équation :

$$Cr_2O_7K_2 + 4\ SO_4H_2 + CH_3OH \rightarrow CO_2 + (SO_4)_3Cr_2 + SO_4K_2 + 6\ H_2O.$$

Ces 200 γ réduisent 1,8375 mg de bichromate correspondant environ à 0°,05. L'erreur commise est de 1/20 de degré par excès dans ce cas extrême et de 0°,025 pour une teneur moyenne de 100 mg, dans le cas des vins rouges vieux. Comme le méthanol a une densité voisine de l'éthanol, il exerce sur la densité du distillat une action analogue. Pour une teneur en méthanol de 200 mg on aura une augmentation de degré de 0°,025 au maximum et de 0°,01 dans le cas d'une richesse moyenne en ce constituant. Il s'ensuit que le procédé chimique donnera par suite de la présence du méthanol dans les vins, des chiffres supérieurs de 0°,01 à 0°,02 par rapport au procédé densimétrique ou pycnométrique.

Les homologues supérieurs de l'éthanol, tels que l'alcool isobutylique et surtout isoamylique peuvent se trouver dans les vins à des doses comprises entre 10 et 100 mg (12). En supposant en première approximation qu'ils réduisent le bichromate suivant la même équation que l'éthanol, le calcul montre qu'ils augmentent le degré au maximum de 0°,01.

Étant plus lourd que l'éthanol, ils affectent par contre les résultats densimétriques de la même erreur, mais par défaut. L'écart du dosage chimique par rapport à la densimétrie, du fait de ces homologues, peut atteindre au maximum 0°,02.

Examinons le cas des esters. On en rencontre jusqu'à 10 milliéquivalents dans les vins vieux constitués presque exclusivement des esters de l'éthanol si bien que, d'après P. JAULMES (*op. cit.* (12)), 500 mg d'étha-

nol par litre de vin, peuvent être ainsi combinés aux acides. PEYNAUD (13) a montré que les vins renferment environ autant d'esters neutres que d'esters acides dans la plupart des cas. Comme seuls, les esters neutres : lactate, acétate, succinate et malate sont assez volatils pour se retrouver en presque totalité dans le distillat on peut donc évaluer à environ 250 γ au maximum, la quantité d'alcool combiné que l'on soumet à l'oxydation en même temps que l'alcool libre. La quantité d'alcool oxydé est donc augmentée d'environ 0°,03 et 0°,01 dans la grande majorité des cas. SEMICHON et l'un de nous (14) ont démontré d'ailleurs que seuls, parmi les acides entraînés sous forme d'esters neutres, l'acide lactique et malique étaient susceptibles de réduire le mélange sulfo-chromique. Donc, si l'on ne neutralise pas le vin avant la distillation, les esters neutres volatils peuvent amener une petite erreur par excès sur le degré alcoolique, d'environ 0°,01 dans la majorité des cas. JAULMES (*op. cit.* (12)) a montré que dans la méthode officielle par suite de l'action des esters, sur la tension superficielle et sur la densité des distillats, cette erreur est par défaut et peut dépasser cette valeur. L'indication du pycnomètre n'est pas affectée par cette erreur.

La présence d'anhydride sulfureux dans le distillat peut occasionner un effet additif non négligeable. MM. FLANZY et BOUDET (*op. cit.* (8)) ont étudié le problème et conclu, qu'à une dose supérieure à 500 mg par litre, il est nécessaire de neutraliser le vin. A cette dose, le calcul prévoit une augmentation de degré de 0°,02 environ.

Donc, en dehors de la présence inévitable dans le distillat, du méthanol et des homologues supérieurs, l'influence des substances oxydables autres que l'alcool peut être facilement éliminée, dans le cas des vins secs, par une légère alcalinisation préalable du vin par un lait de chaux, comme le recommande P. JAULMES dans le procédé officiel par distillation (*op. cit.* (9) et (12)). Néanmoins le titre donné par le dosage chimique devrait être légèrement supérieur de deux ou trois centièmes, à celui donné par les procédés physiques habituels (densimétrie et pycnométrie) par suite de l'oxydation des homologues de l'éthanol.

2. Oxydation et volumétrie

La réaction d'oxydation telle qu'elle a été étudiée par SEMICHON et FLANZY a été éprouvée par une expérience suffisamment longue pour être encore discutée. Sans aller aussi loin que MARTRAIRE (15), qui concluait, que si la dose d'oxydant n'est pas double de celle théoriquement nécessaire, le rendement est déficitaire, il semble toutefois que l'on puisse se ranger à l'opinion d'AGABALIANTZ (*op. cit.* (2)), qui dilue le vin de moitié dès que sa richesse alcoolique dépasse 15°. Les travaux de SEMICHON et FLANZY (*op. cit.* (1)) montrent que la réaction est complète dans 10 mi-

nutes tant que l'excès d'oxydant est supérieur à 1/20 de la dose initiale. Cependant les erreurs observées par les manipulateurs qui dosaient des vins de fort degré pouvaient provenir des erreurs relatives élevées commises lors de la lecture du volume trop faible de la solution réductrice en cours de titrage, et non du rendement de la réaction. La dilution de l'acide sulfurique telle que la préconisent les Américains évite bien de refroidir les liqueurs, mais elle prolonge la durée du dosage de 20 minutes. De plus, pour éviter toute perte d'acétaldéhyde en ne mélangeant pas l'acide sulfurique et l'oxydant avant d'ajouter l'alcool, les trois liquides restant superposés par ordre de densité, comme l'ont fait JOSLYN et AMERINE, on consomme souvent plus d'oxydant que n'en prévoit la théorie. P. JAULMES et ses collaborateurs attribuent le phénomène à une oxydation préalable énergique en anhydride carbonique et eau, d'une partie de l'alcool durant les premiers instants du mélange. Pour toutes ces raisons, il est préférable de conserver pour l'oxydation, le mode opératoire de SEMICHON et FLANZY.

Les dilutions du distillat de façon à augmenter les volumes pipetés, sont une amélioration incontestable car elles diminuent les erreurs relatives.

L'évaluation de l'excès d'oxydant pose le problème du titrage du bichromate. SEMICHON et FLANZY ont adopté le procédé délicat de MARTIN (16), et utilisent la liqueur ferreuse, avec un indicateur externe. AGABALIANTZ (*op. cit.* (2)) a préféré recourir à l'iodométrie. Le virage est plus net, mais l'emploi d'une solution de thiosulfate 0,1N nécessite de grands volumes de réactifs et de plus, la forte acidité du milieu rend aléatoire la décomposition quantitative de l'iodure de potassium. Le titrage du bichromate par le sel de Mohr à l'aide d'un indicateur de potentiel d'oxydo-réduction est préférable. De tels indicateurs ont été employés dans le dosage de l'alcool par oxydation chimique, pour la première fois, par KOSTUK (17) qui utilisait la diphénylamine en présence d'acide phosphorique en 1930, puis par M. FLANZY, en 1935 (*op. cit.* (10)) et enfin par PALLAUD (18) en 1949. Tous ces auteurs utilisaient la diphénylamine en solution sulfurique d'après les données de KNOPP (19). Le potentiel de cet indicateur est parfaitement adapté au système $Cr^{6+} \leftarrow Cr^{3+}$. Toutefois sa faible solubilité, son instabilité et surtout son caractère irréversible restreignent beaucoup son intérêt. Le choix de l'orthophénanthroline ferreuse tel que l'emploient AMERINE et JOSLYN (*op. cit.* (6)) par le procédé de simple retour, est mauvais. En effet, son potentiel de virage (1 100 mV à pH = 0) n'est utilisable qu'avec les oxydants énergiques tels que le permanganate (Eo = 1 500 mV à pH = 0) ou les sels cériques.

Le mélange sulfo-chromique a un potentiel normal de 1 200 mV à pH = 0 (20) ; dans ces conditions, le potentiel de virage de l'ortho-

phénanthroline est trop rapproché de cette valeur pour que la réaction de réduction puisse être considérée comme complète et quantitative : l'évaluation de l'excès d'oxydant risque d'être légèrement déficitaire. P. JAULMES, DIEUZEIDE et Mlle HAMELLE (*op. cit.* (5)) ont tourné la difficulté par le procédé ingénieux du double retour et terminent le titrage par une solution étalonnée de permanganate. Dans ces conditions, l'ortho-phénanthroline convient parfaitement. Cet indicateur pourrait être employé avec succès dans le procédé de NICLOUX (21) de dosage de traces d'alcool dans lequel l'excès de bichromate est évalué par double retour, par manganimétrie. Le virage est net, toutefois, l'adjonction de la liqueur de permanganate augmente le nombre de lectures de volumes, donc d'erreurs accidentelles et prolonge un peu le dosage. Le titrage direct du bichromate par le sel de Mohr, avec un indicateur redox mieux adapté, faciliterait beaucoup le dosage.

Ces considérations nous ont guidés dans l'étude qui suit.

III. — NOUVELLES RECHERCHES SUR LA MÉTHODE SULFO-CHROMIQUE

1. Choix d'un indicateur d'oxydo-réduction

Nous avons étudié le diphényl-amino sulfonate de baryum, en solution aqueuse à 0,5 p. 100, dont le potentiel de virage convient au système :

$$CrO_4H^- + 7\,H^+ + 3\,e \rightarrow Cr^{+++} + 4\,H_2O (E_0 = 1200\ mV)$$ (*op. cit.* (20)).

Cet indicateur vire en effet de l'incolore au violet pourpre, dès que le potentiel d'oxydo-réduction atteint 830 mV en solution sulfurique N. Il présente sur la diphénylamine, l'avantage d'être reversible et stable en solution (*op. cit.* (20)).

SAWER et KOLTHOFF en 1931 (22), puis VILLARD et YOUNG en 1933 (23) ont précisé les conditions de son emploi. Sa gamme d'utilisation est très étendue : depuis les milieux très acides ($SO_4\,H_2$, 10 N) jusque vers pH = 3. Comme des traces d'ions ferreux sont nécessaires pour catalyser son virage, il convient parfaitement pour le titrage de bichromate de potassium par le sel de Mohr. Cependant, la présence d'ions nitriques gêne le virage, ce qui exclut son emploi dans les milieux nitrochromiques. Sous forme de sel de sodium ou de baryum, ses solutions aqueuses saturées (0,5 p. 100)sont stables indéfiniment. Employé à raison de 4 à 5 gouttes pour 100 ml de réactifs, il consomme environ 0,1 ml de solution oxydante N/100.

Comme les concentrations en ions Cr^{+++} et en ions H+, sont assez élevées dans la méthode SEMICHON et FLANZY, il a été nécessaire

de déterminer des conditions de dilution acceptables et compatibles avec une bonne marche de la réaction. Nous nous sommes arrêtés au procédé suivant :

On étend avec de l'eau distillée, le mélange acide oxydant à titrer de manière à se trouver en solution sulfurique N, puis on ajoute de l'acide phosphorique en quantité suffisante pour complexer le fer ferrique et abaisser rapidement le potentiel du point équivalent.

On ajoute le réactif et on titre par la solution de sel de Mohr 0,345 N (135 g/l). Dès que le potentiel du mélange atteint une valeur voisine du point de virage de l'indicateur, le milieu se colore en violet foncé et une goutte de liqueur réductrice suffit à faire disparaître la coloration violette. Le point de virage est net, car le mélange devient vert translucide.

L'oxydation d'une partie aliquote du distillat est pratiquée dans un Erlenmeyer de 750 ml de préférence, et bouché émeri. L'étanchéité du rodage sera plus sûre en graissant le bouchon par 2 gouttes d'acide phosphorique pur (*op. cit.* (7)). Au moment du titrage, on ajoute 325 ml d'eau distillée et 36 ml d'acide ortho-phosphorique concentré, mesurés avec des éprouvettes graduées, puis 1 ml de solution aqueuse à 0,5 p. 100 de diphénylaminosulfonate de baryum, et la liqueur réductrice de sel de Mohr, jusqu'à ce que le mélange devienne translucide.

2. Étude des causes d'erreurs

a) Erreurs systématiques

L'erreur systématique par perte d'alcool au moment de la distillation est nulle si l'on prend soin de suivre, pour cette opération, le mode opératoire recommandé par SEMICHON et FLANZY (*op. cit.* (1)) puis par P. JAULMES (*op. cit.* (7)). Si l'on neutralise le vin, les homologues de l'éthanol donnent une erreur par excès, ne dépassant pas 0°,03.

Celle qui pourrait provenir d'une volatilisation de l'aldéhyde pendant le premier temps de l'oxydation, peut être évitée en travaillant à la température du laboratoire (*op. cit.* (1)).

La seule erreur systématique importante affectant le résultat final du dosage, peut venir du titre de bichromate.

On aura des chiffres par excès ou par défaut, suivant qu'il sera plus faible ou plus fort que le titre calculé théoriquement.

Examinons d'abord la valeur exacte théorique de ce titre. Il est ajusté de manière à s'adapter à la définition du degré alcoolique légal, basé sur la quantité exprimée en volume d'éthanol absolu, pris à la température de 15°C, contenue dans un volume de mélange de 100 ml mesuré à 15°C.

En titrimétrie, les résultats s'expriment en général par des masses

de réactifs et le titre de bichromate doit être tel que 1 ml de ce réactif oxyde exactement la masse d'alcool contenu dans 1 ml de vin dont la richesse alcoolique est de 1° à la température de 15°C. SEMICHON et FLANZY avaient, d'après MARTIN (*op. cit.* (14)) adopté le titre de 33,832 mg par litre de liqueur. P. JAULMES (*op. cit.* (9)) a fait remarquer que ce titre était légèrement erroné, compte tenu de la densité absolue ramenée au vide, de l'éthanol qui, à 15°C a été reconnue égale à 0,793.634 par le bureau international des poids et mesures. En 1953, cet auteur a préconisé avec DIEUZEIDE et Mlle HAMELLE (*op. cit.* (7)) l'emploi d'une liqueur renfermant 33, 791 mg de bichromate de potasse dans un millilitre mesuré à 15°C.

Le chiffre adopté par MARTIN, SEMICHON et FLANZY, correspondrait donc à une masse d'alcool qui occuperait à 15°C un volume légèrement supérieur à 0,01 ml. En partant de la densité absolue ramenée au vide de l'éthanol pur, à la température de 15°C et en se basant sur l'équation théorique d'oxydation de l'éthanol en éthanoïque, nous avons trouvé que 33. 805 mg de bichromate de potasse sont, dans ces conditions, exactement réduits par tout l'alcool contenu dans un millilitre de mélange hydroalcoolique dont la compositon centésimale en volume est de 1° à 15°C. Ce titre calculé varie d'ailleurs légèrement avec les valeurs choisies pour masses moléculaires des réactifs. Pour ce calcul, nous avons utilisé les valeurs données par le tableau des masses atomiques de Marcel BOLL (24). En prenant comme titre 33.805 g de bichromate de potasse dissous dans un litre d'eau à 20°C, on trouvera un degré centésimal en volume supérieur de 0°,01 pour un vin de 10°, à celui trouvé avec le titre de MARTIN, et inférieur de 0°,002 pour le même vin, par rapport au titre adopté par P. JAULMES et ses collaborateurs. Le même calcul exécuté en partant de la densité absolue ramenée au vide de l'éthanol, à la température de 20°C, nous a conduits à adopter le titre de 33,621 de bichromate de potasse dans un litre d'eau à 20°C pour exprimer le degré centésimal en volume à la température de 20°C, par rapport à l'eau à 20°C.

Ces considérations montrent que l'on peut éliminer l'erreur systématique due au titre du bichromate en partant d'un produit très pur, ou si besoin est, purifie par recristallisation ainsi que l'ont indiqué SEMICHON et FLANZY (*op. cit.* (1)).

On évitera de le titrer par les méthodes volumétriques habituelles. En effet, en volumétrie, les résultats ne peuvent être exprimés à mieux de ± 0,1 p. 100 et souvent l'iodométrie donne plus de ± 0,5 p. 100. Dans ces conditions, l'erreur systématique selon le titre adopté risque de n'être plus négligeable. Calculons de combien le résultat final sur un vin de 10° peut être affecté pour une erreur relative sur le titre de bichromate de 0,5 p. 100 et en ne tenant compte que de cette erreur seulement.

En prenant 33, 805 comme titre théorique de la liqueur oxydante et

soit T le titre du bichromate utilisé, la formule donnant le degré alcoolique est :

$$D = 20\left(1 - \frac{n}{N}\right)\frac{33805}{T} = 20\ K\left(1 - \frac{n}{N}\right) \qquad (1)$$

en posant $K = \frac{33\,805}{T}$, N étant le nombre de ml de liqueur réductrice correspondant à 20 ml de liqueur oxydante et n le nombre de ml de la même liqueur réduisant l'excès d'oxydant.

En ne tenant compte que de l'erreur accidentelle finale commise sur le titre du bichromate, la formule des erreurs relatives appliquée à la relation, (1) donne :

$$\frac{dD}{D} = \pm\frac{dT}{T} = \pm\frac{dK}{K}$$

Si T est donné à 0,5 p. 100 près, on aura, que $\frac{dT}{T} = \frac{0{,}5}{100}$.

L'erreur absolue résultante sur le degré D sera :

$$dD = \pm D\frac{dT}{T} = \pm 10\frac{0^{\circ}5}{100} = \pm 0^{\circ}005.$$

Donc, pour les deux valeurs extrêmes adoptées comme titre, on peut trouver pour un vin de 10° deux valeurs différant de 1/10 de degré.

Pour les mesures de grande précision et toutes les fois qu'il sera inévitable de titrer le bichromate, il sera donc préférable de l'étalonner par rapport à un mélange hydro-alcoolique préparé à partir d'un éthanol extra-neutre soigneusement rectifié et dont le titre a été déterminé au pycnomètre, après dilution convenable.

En partant de la formule (1) dans laquelle on connaît D, on déterminera K avec précision et une fois pour toutes. Pour un titre de 10° environ, et en admettant que le pycnomètre donne le 1/20 de degré, on déterminera K à environ 5/1 000 près.

L'exactitude n'est guère supérieure à celle d'un bon dosage iodométrique, mais la fidélité est beaucoup plus grande, en raison de l'instabilité des liqueurs titrées de thiosulfate ou de sel de Mohr.

L'erreur relative peut atteindre quelquefois ± 1 p. 100 ; l'écart est alors de 0°,2 pour les deux valeurs extrêmes prises comme titre.

b) **Erreur accidentelle sur la mesure des volumes**

On doit mesurer le volume du vin avant distillation à la température de 15°C, si la liqueur oxydante est étalonnée par rapport à un volume d'alcool mesuré à cette température.

Pour cette opération, on pourra utiliser une pipette de précision jaugée à cette température ou à défaut, à la température de 20°C, en

négligeant la contraction du verre durant le pipetage. La dilution du distillat et les mesures ultérieures pourront être effectuées sans inconvénient, à la température du laboratoire voisine de 20°C.

La partie aliquote du distillat à oxyder renfermera une masse d'éthanol correspondant à celle contenue dans un millilitre de vin mesuré à la température de référence choisie.

Examinons maintenant les différentes erreurs dues aux mesures de volumes. Pour des liquides dont la capillarité est voisine de celle de l'eau pure, on estime que les mesures de volumes exécutées avec des pipettes bien dégraissées sont sûres à $\pm$ 0,1 p. 100 près. En ce qui concerne le pipetage du vin, nous donnons la préférence à une pipette de précision de 25 ml. Comme fioles jaugées, nous employons pour le distillat, une fiole de 250 ml à 20°C dont le volume est sûr à $\pm$ 0,1 p. 100 près. L'erreur est plus élevée sur les volumes donnés par les burettes. Nous avons utilisé une burette donnant environ 4 gouttes par dixième de millilitre, l'erreur est d'environ $\pm$ 0,20 p. 100 pour un volume lu d'au moins 10 ml en attendant trente secondes pour chaque lecture. C'est pourquoi pour des distillats dépassant 15°, il est préférable de les recevoir dans des fioles jaugées de 500 ml à 20°C et de multiplier par deux le résultat final. Dans ces conditions, l'erreur maximum due aux lectures de volumes, en comptant l'étalonnage de la solution oxydante par la solution ferreuse, est :

$$\frac{\Delta D}{D} = \pm \frac{0,9}{100} \qquad \text{soit pour un vin de } 10^{\circ} : \Delta D = \pm 0,09.$$

Cette erreur est d'autant plus élevée que le degré alcoolique du vin est plus fort. Nous verrons d'ailleurs que ces erreurs accidentelles arrivent à se compenser et que les méthodes statistiques donnent une erreur probable beaucoup plus faible.

3. Nouveau mode opératoire

Les considérations précédentes nous ont conduit à adopter pour la détermination du degré alcoolique des vins, le mode opératoire suivant :

1. Distillation

25 ml de vin mesurés à 15°C sont placés avec 50 ml d'eau dans un petit appareil à distiller constitué par un ballon de 250 ml surmonté d'une petite colonne rectificatrice, et relié à un réfrigérant de West de 20 cm de longueur utile placé verticalement. Un ballon jaugé de 250 ml ou de 500 ml suivant la teneur en alcool du vin, est placé au bas du réfrigérant en ayant soin, pour éviter toute perte d'alcool, de prolonger le réfri-

gérant par un tube effilé plongeant dans 100 ml d'eau. On peut aussi utiliser avec avantage le dispositif JAULMES (*op. cit.* (7)) comprenant un tube latéral de 20 cm de long et de 10 mm de diamètre, soudé au bas du réfrigérant et rempli d'une matière humidifiée telle que billes de verre ou hélice de toile métallique, de façon que l'air chassé au début de l'opération soit lavé dans ce tube et y abandonne l'alcool qu'il a entraîné.

Le vin doit être neutralisé, s'il renferme plus de 300 mg de SO_2 par litre, dans le cas des vins secs. Il est nécessaire de distiller au moins 50 ml de liquide avant de porter le distillat à 250 ml ou 500 ml avec de l'eau distillée à 20°C.

2. Oxydation

Dans un flacon bouché à l'émeri de 750 ml, on place 20 ml de la solution titrée de bichromate, puis 10 ml d'acide sulfurique pur à 1,81 de densité. On agite et l'on refroidit sous un courant d'eau à la température du laboratoire (aux environs de 18°C). On ajoute 10 ml de distillat, en agitant doucement par un léger mouvement giratoire, on bouche le flacon en ayant soin de mouiller le bouchon par 2 gouttes d'acide phosphorique pur, pour en augmenter l'étanchéité. On attend 15 minutes.

3. Titrage

On introduit alors 325 ml d'eau distillée, puis 35 ml environ d'acide orthophosphorique à 85 p. 100 (d = 1,71) et 1 ml de solution aqueuse de l'indicateur. Après homogénéisation, on ajoute la liqueur titrée réductrice jusqu'à décoloration complète.

4. Solutions

— Liqueur titrée de bichromate de potassium : 33.805 g de ce sel dissous dans une quantité d'eau distillée suffisante pour faire un litre à 20°C.

Ce titre correspond au degré alcoolique français 15°C/15°C.

33.621 g de ce sel par litre de liqueur à 20°C correspondent au degré alcoolique exprimé en pour cent d'éthanol en volume à 20°C/20°C.

— Liqueur réductrice de sel de Mohr : on dissout 135,2 g de sel de Mohr et 20 ml d'acide sulfurique dans une quantité suffisante d'eau pour faire un litre.

Ce titre est tel que 2 ml de cette liqueur oxydent 1 ml de liqueur de bichromate.

— Réactif au diphénylaminosulfonate de baryum : On dissout 0,5 g de ce sel dans une quantité d'eau suffisante pour faire 100 ml (solution saturée). Se conserve très bien.

5. Calcul

Le degré alcoolique est donné par la formule :

$$D = 20\left(1 - \frac{n}{N}\right)$$

N est le volume de liqueur réductrice correspondant à 20 ml de liqueur oxydante ; n est le volume de liqueur réductrice réduisant l'excès d'oxydant.

Si le titre T du bichromate déterminé avec précision est différent du titre théorique (33.805 ou 33.621 suivant le cas), on adoptera le degré donné par :

$$D = 20\left(1 - \frac{n}{N}\right)\frac{33\,805 \text{ ou } 33\,621}{T} = 20 \times K\left(1 - \frac{n}{N}\right).$$

Par rapport à l'ancienne méthode SEMICHON et FLANZY, ce procédé semble plus onéreux, mais la stabilité de l'indicateur et sa commodité d'exécution compensent largement le prix de revient des réactifs.

IV. — ÉTUDE COMPARÉE DU DOSAGE CHIMIQUE PRÉCÉDENT ET DE LA MÉTHODE DU PYCNOMÈTRE

Pour mettre en évidence les possibilités de la détermination du degré alcoolique du vin par oxydation sulfochromique, il nous a paru intéressant de la comparer au procédé le plus précis actuellement connu : l'évaluation de la densité d'un mélange hydroalcoolique par pycnométrie. Pour cela, nous avons choisi la technique simplifiée de P. JAULMES, telle qu'elle est décrite dans son traité d'analyse des vins (2e édition) (*op. cit.* (9)).

La comparaison s'est effectuée sur deux groupes d'expérimentations : l'une comprenait une série de déterminations par les deux procédés sur un mélange hydroalcoolique synthétique obtenu en diluant une quantité d'alcool extra neutre à 99,5 p. 100 avec de l'eau distillée de manière à obtenir un titre d'environ 10 p. 100 L'autre, une seconde série de déterminations chimiques et pycnométriques entreprises sur les distillats d'un vin rouge, de 11°.

Aux séries de résultats obtenus dans ces deux groupes, nous avons appliqué la méthode de calcul statistique des écarts de FISHER (25) pour les petits nombres.

1° ESSAIS SUR LA DILUTION AQUEUSE D'ETHANOL EXTRA-NEUTRE

A partir de cette solution titrant environ 10°, nous avons exécuté 10 mesures pycnométriques à 15°C et en diluant convenablement, 10 dosages chimiques.

Les résultats figurent dans le tableau I suivant :

TABLEAU I

Indications du Pycnomètre	Dosage chimique
9,85	9,89
9,86	9,84
9,86	9,86
9,87	9,86
9,84	9,86
9,89	9,87
9,88	9,85
9,84	9,86
9,87	9,9
9,89	9,9

Le mode de calcul appliqué à ces deux ensembles de valeurs, a été le suivant :

1° Calcul de la moyenne arithmétique de chaque série $\overline{X} = \Sigma\frac{X}{n}$.

2° Calcul de la variance S ou écart type, grandeur caractéristique de la dispersion des mesures autour de la médiane.

$$S = \sqrt{\frac{\Sigma(\overline{X} - X)^2}{n - 1}}.$$

Cette dispersion est d'autant plus faible que S est plus petit.
$(\overline{X} - X)$ est l'écart sur une mesure et n le nombre de mesures.

3° Calcul de l'écart type S' sur la moyenne de n mesures $S' = S/\sqrt{n}$, grandeur $\sqrt{n}$ fois plus petite que l'écart type et qui caractérise la dis-per sion des mesures autour de la vraie valeur suivant une probabilité donnée.

4° Choix du coefficient t de FISHER tel que pour un nombre d'essais donné, les chiffres choisis se trouvent dans les limites de l'écart type calculé avec une probabilité désirée (généralement on prend en chimie analytique P = 95 p. 100). Ce cœfficient est donné par les tables à double entrée de FISHER (26).

5° Localisation de la vraie valeur dont le nombre a 95 p. 100 de chances de se trouver dans les limites données par $\mu = X \pm tS'$.

et vérification si toutes les mesures se trouvent bien dans une proportion de 95 p. 100 dans les limites de $X = \overline{X} \pm tS$.

6° Expression de la fidélité de la méthode à l'aide de ces grandeurs en opérant de la manière suivante :

On applique le calcul précédent aux deux populations représentées

par les deux séries de résultats obtenus par les deux méthodes comparées. Puis on fait la différence des moyennes $\overline{X}p$-$\overline{X}c$. Ensuite, on divise ce nombre par l'écart-type calculé S' de la méthode que l'on compare (ici le dosage chimique) on a :

$$t'_c = \frac{\overline{X}_p - \overline{X}_c}{S'_c}.$$

La valeur t'c constitue le coefficient expérimental que l'on compare au coefficient théorique choisi tc dans les tables de FISHER (*op. cit.* (25)). Si ce dernier est supérieur $t_c > t'_c$ la méthode comparée ne comporte pas d'erreur systématique par rapport à la première considérée comme l'étalon et la méthode de calcul utilisée pour évaluer les limites de la vraie valeur, est légitime.

En effet, le mode de calcul statistique précédent ne s'applique que :

a) s'il n'existe aucune erreur systématique importante ;

b) si les mesures ont été choisies absolument au hasard parmi toutes les mesures possibles pour définir S' et légitimer le choix de *t* correspondant à une probabilité de groupement autour de la médiane de 95 p. 100 des mesures.

On exprimera la fidélité par une grandeur caractéristique de la dispersion des résultats autour de la valeur moyenne, en tenant compte du nombre de mesures et de la probabilité choisie (95 p. 100 en général).

Pour une mesure on prendra $\pm \frac{ts \times 100}{\overline{X}_c}$ et pour la moyenne $\pm \frac{t's \times 100}{\overline{X}_c}$ en valeur relative.

Il ne nous est pas possible d'évaluer l'exactitude car on ne peut connaître la vraie valeur. Comme la notion de précision englobe les notions de fidélité et d'exactitude, pour la même raison il ne nous est pas possible de la définir de façon absolue, à cause de l'impureté de nos réactifs et de l'imperfection de nos instruments de laboratoire.

Pour les deux procédés étudiés, nousde vons donc nous contenter de la fidélité. Voici les résultats que nous avons obtenus dans ces conditions.

TABLEAU II

Procédé étudié	Pycnomètre	Dosage chimique
Nombre d'essais	10	10
$\overline{x}$	9,865	9,969
S	0,01838	0,0208
S'	0,0058	0,00657
t	2,262	2,262
P	95 %	95 %
Valeur vraie	$9,85 \leqslant p \leqslant 9,88$	$9,85 \leqslant d \leqslant 9,88$
Limite des mesures	$9,83 \leqslant xp \leqslant 9,9$	$9,82 \leqslant xo \leqslant 9,92$
Fidélité d'une mesure	$\pm$ 0,4 %	$\pm$ 0,5 %
Fidélité de la moyenne autour de la vraie valeur	$\pm$ 0,14 %	$\pm$ 0,15 %

Faisons la différence des moyennes ; on a :

$$\overline{X} - \overline{X}' = 0{,}004 \qquad t'_c = \frac{0{,}004}{0{,}00657} = 0{,}608$$

on voit donc que :
t'_c est bien $< t_c$ ($= 2{,}262$). Le procédé chimique est donc parfaitement comparable à la méthode du pycnomètre car il ne comporte pas d'erreur systématique se traduisant par une différence significative entre les deux populations. On peut vérifier que dans les deux méthodes, aucun résultat n'est aberrant, et que tous les chiffres se groupent dans les limites calculées justifiant ainsi le mode de calcul précédent.

Ces conclusions montrent que l'oxydation de l'alcool par le mélange sulfo-chromique dans les conditions de SEMICHON et FLANZY s'effectue bien avec un rendement conforme à la théorie. Les résultats sont donnés avec une fidélité et une exactitude comparables à celles du procédé physique le plus fin pour doser l'alcool actuellement connu. Bien que les conclusions de cette expérience n'aient qu'une valeur relative du fait qu'elle a été conduite avec du matériel de laboratoire courant : balance au 1/10 de mg, poids non étalonnés et non corrigés de la poussée de l'air, elles constituent cependant un argument de plus en faveur de l'utilisation comme base d'alcoométrie de l'oxydation chromique de l'éthanol.

Enfin, elles justifient qu'il est rationnel de titrer éventuellement la liqueur de référence de bichromate par rapport à un mélange hydroalcoolique dont la densité relative à 15°C et par suite, le titre, sont exactement connus.

2° ESSAIS SUR LES DISTILLATS D'UN VIN ROUGE DES CORBIÈRES

On a effectué 12 distillations suivant les deux méthodes et l'on a évalué leur richesse alcoolique par le pycnomètre et par voie chimique. L'application du mode de calcul précédent a donné les résultats suivants : (tableau III)

Ici encore, le t'_c expérimental pour une probabilité de 95 p. 100 de groupement des résultats et pour un nombre d'essai égal à 12, a été trouvé égal à 0,385, il est bien inférieur à 2,201 t théorique choisi. Tous les chiffres sont groupés dans les limites calculées et aucun résultat n'est aberrant, le mode de calcul précédent est justifié. On voit que la distillation n'a entraîné aucune différence significative dans les résultats et, dans ce cas, l'effet des substances volatiles, autre que l'alcool a été le même dans les deux procédés.

Si nous posons à priori que la vraie valeur est celle qui correspond à la moyenne, identique aux erreurs d'expérience près dans les deux procédés on voit que le résultat est donné dans 95 p. 100, par une mesure quelconque, à $\pm$ 0°,05 près.

TABLEAU III

Méthode utilisée	Pycnomètre	Dosage chimique
Valeurs trouvées	11,04	11,06
	11,03	11,06
	11,04	11,06
	11,05	11,02
	11,04	11,02
	11,05	11,02
	11,06	11,06
	11,07	11,06
	11,01	11,06
	11,06	11,04
	11,09	11,06
	11,07	11,06
Nombre d'essais	12	12
$\bar{x}$	11,05	11,048
S	0,021095	0,018
S'	0,00608	0,00513
t	2,201	2,201
P	95 %	95 %
Valeur vraie	$11,04 \leqslant p \leqslant 11,06$	$11,04 \leqslant d \leqslant 11.06$
Limite des mesures	$11 \leqslant x \leqslant 11,1$	$11,01 \leqslant x \leqslant 11,09$
Fidélité d'une mesure	$\pm$ 0,5 %	$\pm$ 0,4 %
Fidélité de la moyenne	$\pm$ 0,13 %	$\pm$ 0,1 %

IV. — CONCLUSION

Les nombreuses modifications apportées à la méthode SEMICHON et FLANZY, montrent l'importance que les œnologues attachent à ce mode de détermination du degré alcoolique des vins. Cela tient à ce que les divergences des résultats fournis par plusieurs laboratoires, relatifs au titre alcoolique d'un même vin, révèlent les lacunes du procédé officiel. Comme la fidélité et l'exactitude du procédé chimique sont de plus en plus appréciées, il est permis de penser que dans un proche avenir, l'unanimité des œnologues acceptera de baser l'alcoométrie sur l'oxydation sulfo-chromique de l'éthanol, proposée depuis longtemps (27) et (*op. cit.* (7)).

Le travail précédent met en évidence ces trois faits :

1° L'emploi du diphénylamino sulfonate de baryum, comme indicateur d'oxydo-réduction dans le dosage du bichromate, accroît la sensibilité de la méthode SEMICHON et FLANZY, sans changer les conditions de l'oxydation.

2° Une verrerie bien dégraissée, soigneusement étalonnée, et de capacité convenable, augmente encore la précision, de façon à la rendre comparable à celle de la « méthode du pycnomètre », procédé le plus sûr actuellement connu pour déterminer le degré alcoolique des vins.

3° La comparaison des valeurs obtenues en appliquant les deux procédés à des dilutions préparées à partir d'un éthanol exempt d'impu-

reté à 0,5 p. 1 000, montre que l'oxydation en éthanoïque de l'éthanol, est bien conforme à l'équation théorique.

Ces résultats constituent un argument de plus en faveur de l'adoption de la chromométrie comme base officielle internationale de mesure du degré alcoolique des vins.

BIBLIOGRAPHIE

(1) SEMICHON (L.) et FLANZY (M.). — Dosage de l'alcool dans les Vins et Spiritueux par l'emploi du mélange sulfo-chromique. *Ann. Fals. Fraudes*, **22**, 139 et 414, 1929, **23**, 247, 1930.

(2) AGABALIANTZ (G.). — Le dosage de l'alcool par la méthode au bichromate de potassium. Recueil de travaux du laboratoire œnochimique du Don. *S.S.S.R.*, **83**, 1931.

(3) JOSLYN (M. A.) and AMERINE (M. A.). — Commercial production of dessert wines. *Calif. Agr. Exp. Stat. Bule*, **651**, p. 1, 186, 1941.

(4) FESSLER (J. H.). — Alcohol determination by dichromate method Wines and Vines, **22**, 17-18, 1941.

(5) ZIMMERMAN and FESSLER. — Wines et Vines, p. 65, 1949.

(6) AMERINE et JOSLYN. — Table Wines, University of California Press. Berkeley and Los Angeles, 200, 1951.

(7) JAULMES (P.) et DIEUZEIDE (J. C.), Mlle HAMELLE (G.). — Sur le dosage chimique de l'alcool. Trav. Soc. pharm. Montpellier, **13**, 163-8, 1953.

(8) FLANZY (M.) et BOUDET (V.). — Le dosage de l'alcool par le mélange sulfochromique. Influence du gaz sulfureux et de l'alcalinisation du milieu. *Ind. Agr. Alim.*, **66**, 353, 1949.

(9) JAULMES (P.). — Analyse des vins. Librairie Poulain. Montpellier p. 49, édition 1943 et p. 92, édition 1951.

(10) FLANZY (M.). — L'alcool méthylique dans les liquides alcooliques naturels. Thèse Toulouse. Imprimerie régionale p. 70, 1934 et Nouvelle méthode de dosage de faibles quantités d'alcool méthylique. *Ann. Fals. Fraudes*, **28**, 276, 1935.

(11) BERTRAND (G.) et SILBERSTEIN (L.). — Sur la teneur des vins en méthanol. *C.R. Ac. Sc.*, **229**, p. 1281, 1949.

(12) JAULMES (P.). — Quelques causes d'erreurs dans le dosage du degré alcoolique des vins. *Trav. Soc. Pharm. Montpellier*, **158**, 1952.

(13) PEYNAUD. — Etude des phénomènes d'estérification dans les vins. *Revue de Viti.* **86**, 207, 1937.

(14) SEMICHON (L.) et FLANZY (M.). — Application de l'oxydation chromique à quelques monoacides. *C.R.Ac. Sc.*, **194**, p. 1827 et Application de l'oxydation chromique à quelques diacides, 2063, 1932.

(15) MARTRAIRE (H.). — Remarques sur le dosage de l'alcool en distillerie. *Bull. Assoc. des Chim.*, **54**, 712, 1937.

(16) MARTIN. — Détermination du degré alcoolique des vins. Mon. Sci. Quesneville, **17**, 570, 1903 et idem *Chim. et Indust.*, Congrès, 589, 1925.

(17) KOSTUK. — Sur le dosage oxydimétrique de l'alcool éthylique. *Bull. Assoc. des Chim.*, **47**, p. 231, 1930.

(18) PALLAUD. — Le dosage de l'alcool éthylique. *Ann. Chim. Anal.*, **31**, p. 148, 1949.

(19) KNOPP. — Chemicke Listy Prague (Tchécoslovaquie) 75, 1915.

(20) CHARLOT (G.) et Mlle BEZIER (D.). — Méthodes modernes d'analyse quantitative minérale, Masson et Cie, Editeurs, p. 67, 1949.

(21) NICLOUX. — Recherches sur l'alcool éthylique. *Bull. Soc. Chim. Biologique*, **13**, 865, 1931.

(22) SARVER (L. A.) et KOLTHOFF (I. M.). — *J. Amer. Chem. Soc.*, **33**, 1902, 2906, 1931.
(23) WILLARD et YOUNG. — *Ind. Eng. Chem. Anal.*, Ed. **5**, 134, 1933.
(24) MARCEL BOLL. — Memento du Chimiste I, Partie scientifique Dunod édit, **1**, 1949.
(25) FISHER (R. A.). — Statistical methods for Research Workers, Oliver and Boyd Edinburgh and London, 1946.
(26) FISHER (R. A.) et YATES (F.). — Statistical Tables, Oliver and Boyd, Edinburgh and London, 1943.
(27) SEMICHON (L.) et FLANZY (M.). — Au sujet de l'application des décrets relatifs au degré minimum des Vins. *Ann. Fals. Fraudes*, **27**, p. 92, 1934.

POSITION DES LEVURES DU VIN DANS LA SYSTÉMATIQUE

PAR

P. GALZY,

Laboratoire de Recherches de Technologie,
Centre de Recherches Agronomiques du Midi,
Ecole Nationale d'Agriculture de Montpellier.

Depuis la découverte des levures (CAGNARD LATOUR, 1836), de nombreux travaux ont été réalisés sur ces êtres vivants dont l'influence est si importante dans un certain nombre de grandes industries agricoles et en particulier en Œnologie.

On constate que des études se sont poursuivies parallèlement, sans lien entre elles, des points de vue botanique et systématique d'une part, biochimique et technologique d'autre part.

Il en est résulté une certaine confusion : de nombreuses espèces se trouvent en effet, dans la littérature œnologique sous des dénominations qui varient avec les auteurs ou même avec l'époque de parution des divers travaux.

Sur les conseils du Pr NÈGRE, qui pensait qu'un tel travail rendrait service aux œnologues, nous avons été amenés à présenter cette mise au point et à étudier la position dans la systématique des principales levures décrites dans la littérature ænologique.

L'objet de ce premier mémoire est d'exposer succinctement comment a évolué la classification des levures ; un second donnera le nomenclature de celles qui ont attiré l'attention des oenologues.

ÉVOLUTION DE LA CLASSIFICATION DES LEVURES

HANSEN a publié pour la première fois en 1904, une classification rationnelle des levures (1) : les levures ascosporées étaient groupées dans la famille des Saccharomycetées, voisine des Exoasces et des Endomycetées. Il en excluait les *Schizosaccharomyces* à cause de leur mode de division. Les levures anascosporées étaient mises à part et groupées en 3 genres :

Torula,
Mycoderma,
Cryptococcus.

A. Classification des levures ascoporées

1° Classification de GUILLIERMOND (1912)

GUILLIERMOND, dans son livre *Les levures* (2) reprend la classification de HANSEN en la modifiant légèrement.

Il place côte à côte les familles des Endomycetées et des Saccharomycetées

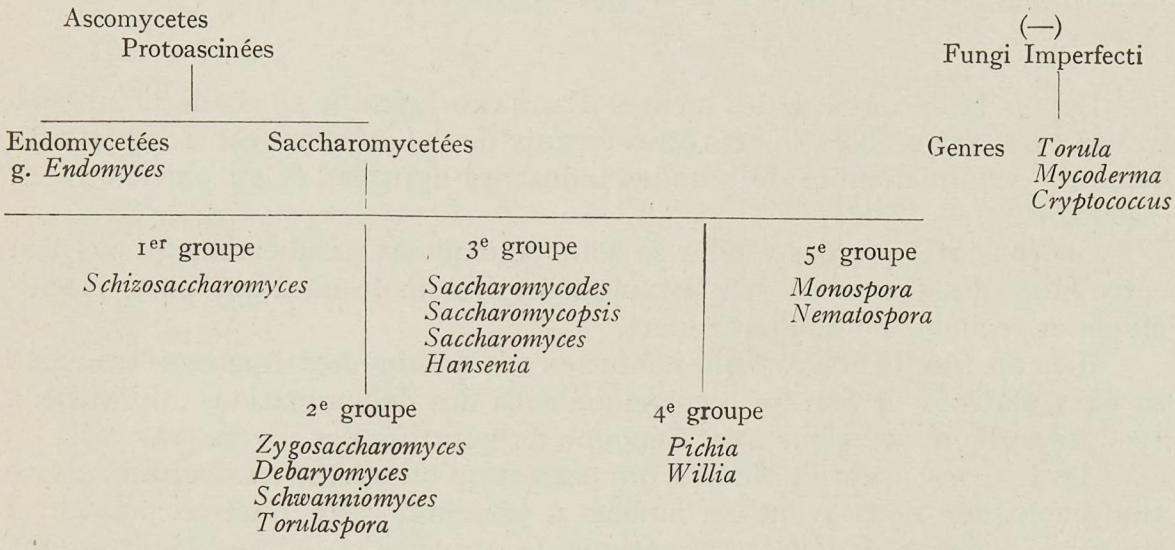
dans le groupe des Protoascinées : il a montré en effet que la deuxième de ces familles dérive phyllogénétiquement de la première.

Il inclut le genre *Schizosaccharomyces* dans les Saccharomycetées, estimant que leur mode de division ne peut justifier leur séparation.

Les divers genres de la famille sont répartis en 5 groupes. Ces diverses modifications aboutissent à la classification du tableau I. Passons en revue les principaux caractères utilisés par GUILLIERMOND.

TABLEAU I

Classification des levures d'après Guilliermond



SEXUALITÉ :

Les travaux de GUILLIERMOND sur la sexualité des levures (3), permettent à cette époque de distinguer deux types fondamentaux dans les levures sporogènes.

Dans le premier cas, les cellules végétatives sont haploïdes. Deux cellules haploïdes copulent parfois pour donner une cellule diploïde. Cette dernière, après division réductionnelle de son « noyau » donnera un asque (*Zygosaccharomyces*).

Dans le deuxième cas, les cellules végétatives sont diploïdes, la phase haploïde étant limitée aux spores.

Les spores copulent avant de donner une multiplication (*Saccharomycodes*).

Ce critère constitue une des bases de sa classification.

BIOCHIMIE :

Le seul test biochimique qu'il utilise est la fermentation des sucres.

BIOLOGIE et MORPHOLOGIE :

Cette première classification de GUILLIERMOND est basée essentiellement sur des critères biologiques et morphologiques.

Les températures optima et limites de la croissance, de la sporulation, de la formation des voiles, etc., jouent un grand rôle dans la définition des espèces.

Les travaux ultérieurs ont montré tout ce que des caractères de cet ordre avaient d'aléatoire ; les températures limites sont très fluctuantes et varient avec les conditions de vie habituelles du clone étudié.

L'étude des colonies géantes est considérée aussi par GUILLIERMOND comme très importante. LANGERON préfère l'étude des colonies adultes. Cette technique plus simple donne des résultats équivalents à la précédente. De toutes façons, l'aspect des colonies ne peut constituer qu'un caractère secondaire : pour une espèce donnée, il peut varier avec les souches étudiées et même avec la composition du milieu de culture.

Par contre, des caractères macroscopiques tels que formation de voiles, d'anneau ou de dépôt en milieu liquide sont réellement des caractères spécifiques stables et ont gardé leur place dans les classifications modernes.

CARACTÈRE MICROSCOPIQUE :

La plupart des caractères microscopiques définis par GUILLIERMOND continuent à occuper une place importante en systématique.

La forme des cellules est en général assez constante pour fournir un test valable. Elle constitue parfois même, un caractère générique : cellule en citron des *Kloeckera*, cellules triangulaires chez les *Trigonopsis*, cellules en bouteille de *Pytirosporum* ; ces formes ne sont cependant pas absolues et les *Kloeckera*, par exemple, ont de nombreuses cellules ovales à côté des cellules en citron.

La taille des cellules peut varier légèrement avec le milieu de culture (culture liquide et culture sur agar par exemple).

Les variations de composition d'un milieu naturel comme l'extrait de malt ne suffiraient cependant pas à modifier la forme et la taille des cellules. Il convient d'opérer toujours avec un milieu identique.

L'utilisation d'un milieu synthétique standard serait même souhaitable d'après WICKERHAM.

La forme des asques et ascospores peut constituer aussi un caractère spécifique et même générique.

Pour une espèce elle peut cependant varier d'une race à une autre ; de même dans le cas d'*Hanseniaspora valbyensis* Klocker, avec l'âge des cultures. Le nombre des ascospores par asque peut être un caractère constant (8 pour *Schizosaccharomyces octosporus*) ; il peut varier pour d'autres espèces. Le mode de bourgeonnement (bipolaire, multipolaire, etc.) est un caractère constant et facile à déterminer. Il peut constituer un caractère spécifique et même générique.

Certains genres ne se multiplient que par bourgeonnement, d'autres par scissiparité, quelques autres possèdent les deux modes.

L'étude de la multiplication végétative constitue également une des bases des classifications ultérieures.

2° **Classification de** STELLING-DEKKER

En 1931, Mme STELLING-DEKKER (4) modifie, par contre, beaucoup plus la classification des levures ascosporées.

Elle groupe les Endomycetacées et les Saccharomycetacées dans une même, famille, celle des Endomycetacées, faisant partie de l'ordre des Protoascinées.

Il existe, en effet, des types intermédiaires entre les deux anciennes familles comme Endomyces javanensis (5) (6).

Mme STELLING-DEKKER base en fait sa classification sur les mêmes données que GUILLIERMOND : présence de mycelium ; mode de reproduction végétative et sexualité. Elle ajoute cependant de nombreux tests biochimiques et abandonne un certain nombre de caractères sans intérêt tels que : température de croissance etc, elle codifie (en collaboration avec KLUYVER) l'étude de la fermentation des sucres.

Enfin elle utilise la méthode auxanographique de BEIJERINCK qui permet une étude précise de l'assimilation des sucres et de diverses sources d'azote.

A ces divers titres, sa classification présente un gros progrès sur les précédentes.

La nouvelle famille est divisée en quatre sous-familles : ces divisions se trouvent résumées dans le tableau II.

TABLEAU II

Classification des levures sporogènes d'après Mme Stelling-Dekker

Ascomycetes — Protoascinées
Endomycetacées

Eremascoïdées	Endomycetoïdées	Saccharomycoïdées	Nematosporoïdées
Eremascus	*Endomyces* *Schizosaccharomyces*		*Monosporella* *Nematospora* *Coccidiascus*

Endomycopsées	Saccharomycetées	Nadsoniées
Endomycopsis	*Saccharomyces* *Torulaspora* *Pichia* *Hansenula* *Debaryomyces* *Schwanniomyces*	*Saccharomycodes* *Hanseniaspora* *Nadsonia*

La sous-famille des Endomycetoïdées groupe les espèces de l'ancien genre *Endomyces* dont le mycelium se multiplie au moyen d'oïdies et le genre *Schizosaccharomyces* qui ne possède pas de mycelium mais dont les cellules sont comparables aux oïdies d'*Endomyces*. Le caractère essentiel de cette sous-famille est donc la multiplication par scissiparité.

Au contraire, la sous-famille des Saccharomycoïdées groupe les espèces se reproduisant essentiellement par bourgeonnement et par conidie-levure. La deuxième partie du genre *Endomyces* forme le genre *Endomycopsis* et la tribu des Endomycopsées (1re tribu des Saccharomycoïdées).

Cette tribu se distingue des deux suivantes par la présence d'un mycelium.

Les Saccharomycoïdées comprennent en outre :

La tribu des Saccharomycetées, correspondant au deuxième et au quatrième groupes de GUILLIERMOND plus le genre de *Saccharomyces*, et la tribu des Nadsoniées correspondant au troisième groupe de GUILLIERMOND moins le genre *Saccharomyces*.

La première de ces deux tribus, groupe les genres dont les cellules bourgeonnent sur toute la surface ; la deuxième, les genres dont les cellules ne bourgeonnent qu'aux deux pôles avec formation d'une cloison entre cellule mère et cellule fille.

La sous-famille des Nematosporoïdées correspond enfin au cinquième groupe de GUILLIERMOND.

De plus, Mme STELLING-DEKKER divise le genre *Saccharomyces* en deux sous-genres :

Saccharomyces
Zygosaccharomyces.

Il en est de même du genre Pichia :

Pichia
Zygopichia.

3° **Classification de** GUILLIERMOND (1936)

Dans son article : « La classification des levures » (6), GUILLIERMOND adopte ultérieurement la classification de Mme STELLING-DEKKER à une modification près.

Il sépare les *Saccharomyces* des *Zygosaccharomyces* en deux genres voisins, le premier groupant les formes à tendance diplobiontiques, le second, les formes haplobiontiques.

Pourtant, des travaux nouveaux (7), étaient venus modifier les connaissances en matière de sexualité des levures. KRUIS et SATAWA (8), puis WINGE (9) ont montré l'existence d'une haplophase et d'une diplophase successives, chez *Saccharomyces cerevisiae* HANSEN.

Les spores germent en donnant des cellules haploïdes qui prolifèrent plus ou moins avant de copuler.

La découverte de ces formes intermédiaires ne parut pas assez importante à GUILLIERMOND pour justifier un rapprochement des *Saccharomyces* et des *Zygosaccharomyces.*

4° **Classification de** LODDER **et** KREGER VAN RIJ 1952

Mlles LODDER et KREGER VAN RIJ (10) n'ont pas partagé cet avis et ont préféré fusionner les 3 genres *Saccharomyces*, *Zygosaccharomyces* et *Torulaspora.* KRUMBHOLZ a trouvé en effet chez une même souche de *Torulaspora rosei* GUILLIERMOND des cellules donnant des tubes de conjugaison avant de sporuler (type *Torulaspora*), et d'autres se conjugant (type *Zygosaccharomyces*). Il semble donc que dans une même souche on puisse trouver tous les intermédiaires entre les trois types.

Une cinquième sous-famille apparaît :

Les lipomycetoïdeae avec le genre *Lipomyces.*

A part ces modifications, les grandes lignes des classifications précédentes sont adoptées.

La classification ainsi corrigée et complétée se trouve résumée dans le tableau III (partie gauche du tableau).

La tendance générale de cette évolution apparaît dans l'importance prépondérante prise par les tests biochimiques. Nets et precis, ils sont aussi en général, très constants. L'étude génétique d'un grand nombre d'entre eux (11-12) a pu être réalisée, ce qui a permis de définir exactement leur valeur systématique.

La même tendance se retrouve dans les classifications des levures ascosporées et anascosporées.

Tableau III

Classification des levures d'après Lodder et Kreger van Rij

Ascomycetes — Protascales

Famille des Endomycetaceae

- Eremascoïdeae
  - *Eremascus*
- Endomycetoïdeae
  - *Endomyces*
  - *Schizosaccharomyces*
- Nematosporoïdeae
  - *Monosporella*
  - *Nematospora*
  - *Coccidiascus*
- Lipomycetoïdeae
  - *Lipomyces*
- Saccharomycetoïdeae
  - Endomycopseae
    - *Endomycopsis*
  - Saccharomyceteae
    - *Saccharomyces*
    - *Pichia*
    - *Hansenula*
    - *Schwanniomyces*
    - *Debaryomyces*
  - Nadsonieae
    - *Saccharomycodes*
    - *Hanseniaspora*
    - *Nadsonia*

Fungi — Imperfecti — Cryptococcales

Famille des Cryptococcaceae

- Cryptococcoïdeae
  - *Cryptococcus*
  - *Torulopsis*
  - *Pityrosporum*
  - *Brettanomyces*
  - *Candida*
  - *Kloeckera*
  - *Trigonopsis*
- Trichosporoïdeae
  - *Trichosporon*
- Rhodotoruloïdeae
  - *Rhodotorula*

B. Classification des levures anascosporées

La classification des levures anascosporées subit de même, de grandes modifications.

1° Dans son livre « Les levures » GUILLIERMOND conserve les 3 genres créés par HANSEN : *Torula, Mycoderma, Cryptococcus.*

Il décrit aussi des *Monilia* du groupe BONORDEN, admettant aussi implicitement la définition de ce genre donnée par VUILLEMIN (1911).

VUILLEMIN (13) avait divisé les Thallosporés, Hyphomycetales dont les spores ne sont que des fragments du Thalle, en 2 groupes.

— Les arthrosporés dont les spores naissent par désarticulation des filaments myceliens en tronçons égaux.

— Les blastosporés dont les spores naissent par bourgeonnement.

Bien qu'ayant posé ainsi les grandes lignes de la classification des Hyphomycetales, VUILLEMIN (13) avait groupé dans le genre *Monilia* des phialidées (*Monilia* groupe GMELIN) et des levures filamenteuses (Monilia groupe BONORDEN), c'est-à-dire, des arthrosporés et des blastosporés.

Ce n'est qu'en 1923 que Mlle BERKHOUT sépare des vrais *Monilia* le groupe BONORDEN pour en faire le genre *Candida* BERKHOUT 1923 (14).

En 1929 : CIFFERI et REDAELLI (15) adoptent les modifications de Mlle BERKHOUT, ils montrent en outre que le terme de *Torula* est à réserver pour des champignons à Thalle fuligineux et adoptent pour les levures de l'ancien genre *Torula,* le nom de *Torulopsis.* Ils créent la famille des Torulopsidacées avec deux sous-familles :

Les Torulopsidées, levures non filamenteuses.

Les Mycotorulées ; levures filamenteuses.

Ils placent malheureusement. le genre *Geotrichum* Link qui est un type arthrosporé parmi les blastosporés.

En 1932, LANGERON et TALICE (16) ont proposé une classification des Mycotorulées, basée sur leur mode de filamentisation.

Ce caractère n'est pas assez constant pour permettre, à lui seul, de définir des genres.

La même année, LANGERON et TALICE ont reconnu leur erreur.

En 1934, Mlle LODDER, dans sa thèse sur les levures anascosporées (17) modifie légèrement la classification de CIFFERI et REDAELLI ; elle crée la famille des Rhodotorulacées qui groupe les levures à pigments caroténoïdes.

En outre, elle donne aux tests biochimiques une importance accrue, et met au point des méthodes d'étude pour l'assimilation des sucres et de l'azote.

2° Dans la période précédente, toutes les classifications étaient basées sur le travail de VUILLEMIN et plaçaient les levures anascosporées dans les Hyphomycétales.

En 1939, BUCHWALD sépare toutes les levures des autres Fungi Imperfecti et les groupe dans l'ordre des Torulopsidales.

Il accepte par ailleurs, la classification de LODDER 1934.

Dans leur monographie de 1952, LODDER et KREGER VAN RIJ acceptent cette modification mais appellent le nouvel ordre : Cryptococcales. La famille des Cryptococcaceae devient la seule famille de l'ordre.

La famille des Rhodotorulacées devient une sous-familleï; la présence de pigments caroténoïdes est décelée par la couleur des colonies, ce qui constitue un critère insuffisant pour définir une famille, car certaines levures donnent

des colonies rouges sans posséder de pigments caroténoïdes. Par contre, le groupe étant constitué d'un seul genre (*Rhodotorula*) très homogène et très différent des autres, une sous-famille a été maintenue. Le genre *Trischosporon* qui est le seul à posséder des arthrospores constitue la sous-famille des Trichosporoïdeae.

Tous les autres genres de l'ancienne famille des Torulopsidacées constituent la sous-famille des Cryptococcoïdeae, la présence ou l'absence de pseudomycelium ne constituant pas un caractère assez net pour justifier la séparation des *Candida* (anciens mycotoruloïdeae) et des Torulopsidoïdeae.

Cette classification se trouve résumée dans le tableau III (partie droite du tableau).

C. Conclusion

A l'heure actuelle, la classification des levures ascosporées paraît beaucoup mieux assise que celle des levures anascosporées. Comme nous l'avons vu plus haut, les trois dernières classifications de Stelling Dekker, Guilliermond et Lodder et Kreger van Rij sont relativement assez voisines ; les différences proviennent surtout de l'importance relative accordée par les divers auteurs à certains caractères, elles s'inscrivent en tout cas dans la même ligne générale.

Par contre, pour les levures anascosporées, l'unanimité ne paraît pas acquise : c'est au moins ce qui apparaît du travail de M. Ansel et C. Gauthier sur la classification du genre *Candida* (18).

Ces auteurs divisent les Cryptococcaceae en deux familles, basant cette séparation sur l'absence ou la présence de pseudomycelium ; ce seul caractère ne paraît pas suffisant pour établir une telle division. De même le maintien d'un genre Mycoderma à côté du genre *Candida*, ne paraît pas souhaitable.

Cependant, nous pouvons relever dans ce travail, deux petites critiques paraissant justifiées, de la classification de Lodder et Kreger van Rij :

Le genre *Trichosporon* étant arthrosporé, il serait plus logique de le rapprocher des *Geotrichum* que de le placer dans la famille des Cryptococcaceae, laquelle groupe par ailleurs uniquement des levures blastosporées.

En vertu de la règle d'antériorité, *Candida Mycoderma* (Rees) Nov. comb. devrait être plutôt appelée *Candida vini* Desmazières.

Ces diverses objections ne sont pas suffisantes pour ébranler la solide construction qu'est l'ouvrage de Lodder et Kreger van Rij.

Nous n'avons pas voulu entrer dans le détail des techniques d'identification. Ceux qui seront intéressés par elles, pourront les trouver dans la bibliographie citée à la fin de ce travail (19).

BIBLIOGRAPHIE

(1) Hansen (E. Ch.). — Grundlinien u. systematik d. Saccharomyceten, Centr. F. Bakter, **71**, 1904.

(2) Guilliermond (A.). — Les levures, O. Doin et Fils, Éditeurs, 1912.

(3) Guilliermond (A.). — Recherches histologiques sur la sporulation des Schizosaccharomycetes. *C. R. Ac. Sciences*, **133**, 1901.

— Recherches cytologiques sur les levures. *Rev. Générale de bot.*, **16**, 1903. — The Yeast. J. Willy, New York, 1920. — Recherches sur la germination des spores dans le Saccharomycodes ludwigii. *Bull. Soc. Myc. de France*, **19**, 1903.

(4) Stelling Dekker. — Die Hefesammlung des Centraal Bureau voor Schimmelcultures. Beiträge zu einer Monographie des Hefearten. Die sporogenen Hefen. *Verhandelingen der Köninklijke, ac. Amsterdam* **28**, n° 1, 1931.
(5) Mlle Manuel. — Étude de l'Endomyces javanensis et l'Endomyces selenospora . *C. R. Soc. Biol.*, **122**, 1936.
(6) Guilliermond. — La classification des levures. *Annales des fermentations*, **2**, 474 et 540, 1936-1937.
(7) Guilliermond. — La sexualité, le cycle de développement et la phyllogénie des levures d'après les travaux récents. *Ann. des Fermentations*, 1936-1937, **2**, 129 et 257.
(8) Kruis (K.) et Satava (J.). — O vyvoji a kliceni spor. *Jakoz i sexualite Kvasinek*, V. Praze, 1918.
(9) Winge (D.). — On haplophase and diplophase in some Saccharomycetes. C. R. Tr. Lab., Carlsberg. Série Physiol., **21**, 1933.
(10) Lodder (J.) et Kreger van Rij. U. J. U. The yeasts. A Taxoconomy-study. *North-Holland Publisching comp.* Amsterdam, 1952.
(11) Pomper. — Récents développements in Yeast Genetics. *Wallerstein Laboratories Communications*, **14**, n° 44, 31, 1951.
(12) Winge et Laustsen. — On two types of spore germination, and on genetic Segregations in Saccharomyces, demonstrates through single — spore culture. *C. R. Travaux des Laboratoires. Carlsberg.* Série Physiologie, B. 6, 5, 99-116, 1937.
(13) Vuillemin (P.). — Matériaux pour une classification rationnelle des Fungi Imperfecti. *C. R. Acad. Sciences*, **150**, 882-884, 1910.
— Différence fondamentale entre le genre Monilia et les genres Scopulariopsis Acmosporium et Catenularia. *Bull. Soc. Mycol. de France*, **27**, 137-152, 1911.
(14) Berkhout (M.). — De Schimmelgeschlachten Monilia Oïdium Oospora en Torula. These Fac. Science Université d'Utrecht, 1923.
(15) Ciferri (R.) et Redaelli (P.). — Studies on the Torulopsidaceae, *Ann. Mycologici*, **27**, 243-295, 1929.
— Contribuzioni alla sistematica delle Torulopsidaceae, **33**, *Archiv. F. Mikrobiol.*, **6**, 3-72, 1935.
(16) Langeron (M.) et Talice (R. V.). — Nouvelles méthodes d'étude et essais de classification des champignons levuriformes. *Ann. parasitologie*, **10**, 1-80, 1932.
(17) Lodder (J.). — Die anaskosporogenen Hefen. Die Hefesammlung des Centraal Bureau voor Schimmelcultures. Beiträge zu Einer monographie der Hefearten. Utrecht, 1934. These Fac. Sciences
(18) Ansel (M.) et Gauthier (C.). — Classification des levures des genres Candida et Mycoderma. Caractères morphologiques et physiologiques. *Ann. de Parasitologie humaine et comparée*, **30**, n° 1-2, 148, 1954.
(19) Langeron (M.) et Guerra (M.). — Nouvelles recherches de zymologie médicale. *Ann. de Parasitologie*, **16**, 36, 1938.
Langeron et Vanbreuseghem. — Précis de mycologie. Masson, édit.

TABLE DES MATIÈRES DE L'ANNÉE 1955

I. — MÉMOIRES ORIGINAUX

Lafourcade (Mlle S.). — Contribution à l'étude des activeurs et des inhibiteurs de la fermentation alcoolique des moûts de raisin (2e partie). 5
Jacquin (P.). — Pectine-Méthylesterase et matières pectiques dans la pomme et la poire. — Leur importance dans la fabrication des cidres et des poirés 66
Dupuy (P.), Nortz (M.) et Puisais (J.). — Le vin et quelques causes de son enrichissement en fer 101
Alais (C.). — Préparation de présure cristallisée à partir d'estomacs de veaux (caillettes) 113
Auclair (J. E.) et Portmann (A.). — Influence du chauffage du lait sur le développement des bactéries. I. — Croissance des bactéries lactiques dans des laits chauffés à des températures variables 121
Deibner (L.). — Evolution du potentiel d'oxydo-réduction au cours de la maturation des raisins 133
Creff (R.) et Jacquin (P.). — Oxydations et réductions en cidrerie 141
Lafon (Mlle M.). — Contribution à l'étude de la formation des produits secondaires de la fermentation alcoolique 169
Bouzigues (Mme L.). — Sur le dosage du méthanol en présence d'éthanol électrophotométrique 223
Lafon (Mlle M.). — Contribution à l'étude de la formation des produits secondaires de la fermentation alcoolique (suite) 241
Lamazou-Betbeder (Mlle) et Pech (Mme). — Application des techniques chromatographiques à l'étude de la fermentation malolactique dans les vins délimités de qualité supérieure de la région de Toulouse 293
Attisso (M.) et Galzy (P.). — Sur quelques aspects de l'utilisation des antibiotiques dans les jus de fruits 301
Deibner (L.) et Bouzigues (H.). — Dosage de l'anion orthophosphorique dans les vins par le procédé électrophotométrique au bleu phosphomolybdique..... 309
Mollard (J.). — Influence des traitements par radiations infra-rouges sur les constituants glucidiques des châtaignes 335
Hermier (J.) et Mocquot (G.). — Etude sur la destruction des microbes et la dénaturation des protéines du lait par un chauffage au-dessus de 100° C 341
Flanzy (M.), Causeret (J.), Hugot (Mlle D.) et Guerillot (Mlle J.). — Contribution à l'étude des boissons alcooliques. — II. — Etude comparée de différents vins et de diverses techniques œnologiques 359
Peynaud (E.) et Lafourcade (Mlle S.). — L'inositol dans les raisins et dans les vins. Son dosage microbiologique 381

Flanzy (M.), Bouzigues (Mme L.) et Bouzigues (H.). — La détermination chimique du degré alcoolique du vin, par le mélange sulfo-chromique. 397
Galzy (P.). — Position des levures du vin dans la systématique 417

II. — DOCUMENTATION

Flanzy (M.). — Remarques sur la concentration des vins par le froid ... 235

III. — BIBLIOGRAPHIE

Ulrich (R.). — Chronique des livres 239

Le Directeur-Gérant : B. LACLAVIÈRE.

Imprimerie BUSSIÈRE à Saint-Amand (Cher), France. — 8-9-1955.
Dépôt légal : 3e trimestre 1955 *N° d'impression : 368*